

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS-PB  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

**Evidência sorológica e molecular de erliquiose canina no município de Patos**

Werona de Oliveira Barbosa

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

**Evidência sorológica e molecular de erliquiose canina no município de Patos**

Werona de Oliveira Barbosa  
Graduanda

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marcia Almeida de Melo  
Orientadora

Patos  
Outubro de 2012

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO CSTR /  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CAMPUS DE PATOS

B238e

2012

Barbosa, Werona de Oliveira

Evidência sorológica e molecular de erliquiose canina no município de Patos / Werona de Oliveira Barbosa - Patos - PB: UFCG /UAMV, 2012.

65p.: il. Color.

Inclui Bibliografia.

Orientador (a): Dr<sup>a</sup>. Marcia Almeida de Melo

(Graduação em Medicina Veterinária), Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1- Saúde Pública 2 – Levantamento epidemiológico. 3 - Canino. I. Título

CDU: 614

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
CAMPUS DE PATOS-PB  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

WERONA DE OLIVEIRA BARBOSA  
**Graduanda**

Monografia submetida ao curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

APROVADO EM ...../...../.....

**EXAMINADORES:**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marcia Almeida de Melo  
- Orientador (a) -

---

Prof. Dr. Edísio Oliveira de Azevedo  
- Orientador -

---

Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo  
- Orientador -

*Dedico este trabalho  
e todas as outras conquistas  
da minha vida  
à minha família,  
porém em especial aos meus pais,  
Francisca (Bebé) e Severino (Biu).*

## AGRADECIMENTOS

*Meu agradecimento maior é por minha família, a qual mesmo nos momentos que não tive fé, eles tiveram o suficiente por mim, por nós.*

*Em especial à minha mãe, Francisca, que com força sem igual, nunca me permitiu faltar nada e nunca deixou de me guiar. Com críticas e elogios, soube me conduzir por esta difícil jornada que é a vida universitária.*

*À meu pai, Severino, que nunca deixou o instinto protetor de lado, que mesmo sabendo que eu podia me virar sozinha, fez questão de não soltar a minha mão.*

*Às minha irmã gemêa Werena e minha irmã mais velha Wanêssa, que mesmo na distância se fizeram presente em todas as etapas deste curso e da minha caminhada.*

*Ao meu esposo Jansenn José e meu filho Jansenn Gustavo, que deram um novo rumo e sentido a minha vida, me tornando uma pessoa melhor, mais determinada e disposta a vencer todos os obstáculos que encontrar.*

*Às minhas primeiras amigas de faculdade, pela ordem em que nos tornamos amigas: Olívia, Eudócia, Pollyana, Siomara, Marianne e Grasiene as quais dividiram comigo os primeiros e mais alegres anos de faculdade e também os últimos e mais difíceis tempos. Mesmo separadas, sempre estarei ligada de alguma forma a vocês.*

*À minha última e fiel companheira de moradia Aline Leal, que sem ela, não teria sido tão divertido passar madrugadas em claro.*

*Aos meus queridos colegas que quando mais precisei deles, durante minha gravidez, tive todo apoio e suporte: Gelson, Jailson, Assis e Acácio.*

*À minha orientadora Marcia Melo, que além do suporte no aspecto científico, se mostrou um exemplo de caráter e determinação.*

*À minha “coorientadora” Tereza Emanuelle, que dividiu comigo toda a trajetória deste trabalho e me ensinou o verdadeiro significado de trabalho em equipe.*

*Por fim, a todos os professores e funcionários da Instituição que me ajudaram a cruzar esta linha de chegada que é a minha formação profissional, em especial, Prof. Gildenor, Prof. Flávio, Prof<sup>a</sup>. Norma, secretária Teresa, e Damião. Tenho um imenso carinho por vocês.*

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	14
2.1 Histórico.....	14
2.2 Gênero <i>Ehrlichia</i> .....	14
2.3 Importância em Saúde Pública.....	16
2.4 Aspectos Epidemiológicos.....	18
2.5 Patogenia e Sinais Clínicos.....	21
2.6 Diagnóstico .....	23
2.6.1 Hematologia e avaliação do esfregaço sanguíneo.....	24
2.6.2 Bioquímica .....	25
2.6.3 Sorologia .....	26
2.6.4 Cultivo celular .....	28
2.6.5 Detecção molecular .....	29
2.7 Tratamento .....	31
2.8 Prevenção.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 Local de Execução .....	34
3.2 Caracterização da Área .....	34
3.3 Análise Estatística.....	34
3.3.1 Amostragem .....	34
3.3.2 Análise dos resultados.....	35
3.4 Questionário Epidemiológico .....	35
3.5 Obtenção das Amostras .....	35
3.6 Extração de DNA.....	36
3.7 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	36
3.8 Reação em Cadeia pela Polimerase convencional (PCRc).....	37
3.9 Reação em Cadeia pela Polimerase em tempo real (qPCR) .....	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
5 CONCLUSÕES .....	48
6 REFERÊNCIAS .....	49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Esquema de classificação antiga e atual das principais espécies do gênero <i>Ehrlichia</i> , <i>Anaplasma</i> e <i>Neorickettsia</i> e suas respectivas células alvos e hospedeiros .....	16
Tabela 2.	Associação das técnicas de RIFI, PCR e da qPCR a partir das 100 amostras de sangue canino .....	41
Tabela 3.	Resultados obtidos a partir da amplificação do gene 16S rRNA por PCR convencional e PCR em tempo real .....	43
Tabela 4.	Associação estatística entre as técnicas RIFI, PCR e real time PCR no diagnóstico da erliquiose monocítica canina .....	44
Tabela 5.	Análise univariada de fatores de risco associados com a soropositividade para <i>Ehrlichia canis</i> em 100 cães do município de Patos, Paraíba .....	44
Tabela 6.	Resultado da análise de regressão logística múltipla para os fatores de risco associados com a soropositividade para <i>Ehrlichia canis</i> em 100 cães do município de Patos, Paraíba ....	46



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Prevalência de anticorpos anti - *Ehrlichia canis* em cães no município de Patos, PB – 2011..... 38
- Figura 2. Produtos da reação em cadeia pela polimerase (PCR) com primers específicos para *Ehrlichia canis*..... 40

## RESUMO

BARBOSA, WERONA DE OLIVEIRA. **Evidência sorológica e molecular de erliquiose canina no município de Patos.** Patos, UFCG. 2012, 66 p. (Monografia submetida ao curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para a obtenção do grau de Médico Veterinário).

A erliquiose é uma das mais importantes enfermidades infecciosas na clínica médica de caninos, sendo a mais comum entre as infecções transmitidas por carrapatos aos cães. O presente trabalho teve como objetivo avaliar, por meio de sorologia e técnicas moleculares, a ocorrência da erliquiose canina no município de Patos, Paraíba, Brasil, além de comparar a sensibilidade e especificidade das técnicas utilizadas. Foram analisadas 100 amostras de sangue oriundas de cães domiciliados, escolhidos aleatoriamente. A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) detectou 65% de animais positivos, a Reação em Cadeia pela Polimerase convencional (PCRc) 84% e a PCR em tempo real (qPCR) 95%. Apenas um animal foi negativo nos três testes. Apenas 1 (uma) amostra foi positiva na RIFI e negativa nas técnicas PCR e qPCR. Quando as técnicas PCRc e qPCR foram comparadas para avaliar sensibilidade e especificidade, o índice Kappa apresentou grau de concordância fraco, justificado pela capacidade da qPCR em detectar baixas quantidades de DNA e do gene utilizado como alvo ter uma maior número de cópias quando comparado ao da PCRc. Através da associação entre a RIFI, PCR e a qPCR foi possível identificar 51% de animais infectados com *E. canis*. Pela análise multivariada, as variáveis identificadas como fatores de risco foram a idade do animal (*Odds ratio* = 1,6869/ IC 95% = 1,15 - 2,48/ p = 0,0079) e o ambiente de criação (*Odds ratio* = 2,2596/ IC 95% = 1,02 - 4,99/ p = 0,0437). A *Ehrlichia canis* apresenta uma alta prevalência no município de Patos-PB e, quando comparadas à sorologia, a PCR e a qPCR foram eficientes na identificação de casos agudos e crônicos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Prevalência, diagnóstico, bactéria, Nordeste.

## ABSTRACT

BARBOSA, WERONA DE OLIVEIRA. **Serological evidence and molecular canine ehrlichiosis in the city of Patos.** Patos, UFCG. 2012, 66 p. (Monograph submitted to the Veterinary Medicine course as partial fulfillment for the degree of Doctor of Veterinary Medicine).

The ehrlichiosis is one of the most important infectious diseases in the canine medical clinic, the most common infection transmitted by ticks to dogs. This study aimed to evaluate, by serology and molecular techniques, the occurrence of canine ehrlichiosis in the city of Patos, Paraíba, Brazil, and compared the sensitivity and specificity. We analyzed 100 canine blood samples. The Immunofluorescence Assay (IFA) detected 65% positive animals, conventional Polymerase Chain Reaction for (cPCR) 84%, and real-time PCR (qPCR) 95%. Only one animal was negative in all three tests. Only one (1) sample was positive by IFAT and negative by PCR and qPCR. When the cPCR and qPCR techniques were compared to evaluate sensitivity and specificity, Kappa coefficients showed poor agreement justified by qPCR ability in detecting low amounts of DNA and the target gene has a larger number of copies. The association between IFT, cPCR and qPCR was possible to identify 51% infected animals with *E. canis*. Multivariate analysis of risk factors identified two variables: age (*Odds Ratio* = 1.6869 / 95% CI = 1.15 to 2.48 / p = 0.0079) and rearing environment (*Odds Ratio* = 2.2596 / 95% CI = 1.02 to 4.99 / p = 0.0437). The *Ehrlichia canis* has a high prevalence in the city of Patos-PB and compared to serology, cPCR and qPCR were effective in identifying acute and chronic cases.

**KEYWORDS:** Prevalence, diagnosis, bacteria, Northeast

## 1 INTRODUÇÃO

A erliquiose é uma das mais importantes enfermidades infecciosas e está distribuída mundialmente. Esta enfermidade acomete caninos, outras espécies domésticas, animais silvestres e o homem, sendo a mais comum entre as infecções transmitidas por carrapatos aos cães.

Nos últimos anos, a erliquiose tem sido identificada como causa crescente de morbidade e mortalidade de caninos e, em alguns países, do homem. A sua ocorrência vem aumentando significativamente em virtude da maior exposição a locais onde é comum a presença do vetor, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, conhecido como o “carrapato marrom do cão”, que se encontra disseminado por toda área urbana e rural do Brasil.

Atualmente, já são conhecidas na América do Sul as espécies *Ehrlichia ewingii* e *E. canis*, sendo esta última responsável pela Erliquiose Monocítica Canina (EMC). No sudeste do Brasil, a EMC é a mais importante doença infecciosa de cães.

A EMC caracteriza-se por uma desordem multissistêmica, de sintomatologia complexa, que varia em intensidade de acordo com a fase clínica da doença. A ampla variação do quadro clínico, aliado ao longo período de portador e a natureza nidícola do *R. sanguineus* contribuíram para a disseminação da *E. canis*, tornando-a uma das doenças infecciosas mais diagnosticadas nos países tropicais.

O diagnóstico presuntivo da EMC é obtido com base nos sinais clínicos e achados laboratoriais, porém a confirmação se dá pela visualização de mórulas em exame de esfregaço sanguíneo nos leucócitos circulantes, titulação de anticorpos anti- *E. canis* ou ainda pela amplificação de genes de *E. canis* com testes moleculares.

A erliquiose canina no Brasil vem apresentando casuística crescente em hospitais e clínicas veterinárias, sendo considerada como uma das mais importantes doenças transmissíveis na clínica de pequenos animais, fato este observado principalmente pela elevada infestação do carrapato vetor.

A descoberta da Erliquiose Granulocítica Humana (EGH) e o isolamento da *Ehrlichia chaffeensis* em seres humanos mostraram que a erliquiose não é apenas um problema para os animais. Atualmente, sabe-se que o agente causador da EGH também pode infectar naturalmente várias espécies domésticas. Da mesma forma, a EMC pode ser patogênica para seres humanos, sendo os organismos causadores de erliquiose humana clinicamente indistinguíveis das espécies que acometem os animais. Relatos recentes

indicaram que *E. canis* pode causar infecções sintomáticas ou assintomáticas em humanos, com evidências sorológicas de erliquiose humana na Argentina e Brasil.

O objetivo desse trabalho foi determinar a prevalência da Erliquiose Monocítica Canina causada por *E. canis* no município de Patos-PB e os possíveis fatores de risco envolvidos na ocorrência da doença.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico

A erliquiose canina foi descrita pela primeira vez na Argélia em 1935, por Donatien e Lestoquard, que observaram organismos nas células mononucleares circulantes de cães infestados por carrapatos, o vetor da doença. Este organismo foi chamado inicialmente de *Rickettsia canis*. Posteriormente, em 1945, foi renomeado como *Ehrlichia canis*, em homenagem a Paul Ehrlich, por Moshkovski (HARRUS et al., 1997; ALMOSNY, 2002). A doença adquiriu um significado especial durante a guerra do Vietnã (1959-1975), onde foi reconhecida como causa da morte de centenas de cães do exército americano (RIKIHISA et al., 1992b). Desde então, são inúmeros os relatos da doença em todo o mundo.

O primeiro caso de erliquiose canina descrito nas Américas ocorreu em 1957, na região das Antilhas Holandesas. A infecção foi associada à *Babesia canis* (ALMOSNY, 2002). Em 1963, houve o primeiro relato de caso da doença nos EUA, no Estado de Oklahoma, identificada através de inclusões celulares no esfregaço sanguíneo de um cão portador de babesiose (RIKIHISA, 1991; ALMOSNY, 2002).

O primeiro relato no Brasil ocorreu em Belo Horizonte, através da observação de mórula em linfócito de cão, chamando atenção dos clínicos e patologistas sobre a presença da infecção no Brasil (COSTA et al., 1973).

### 2.2 Gênero *Ehrlichia*

A erliquiose pode ser causada pelos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma*. Ambos pertencem à ordem *Rickettsiales*, sendo a *Ehrlichia* e a *Anaplasma* pertencentes à família *Anaplasmataceae*. Os representantes destas famílias são parasitas intracelulares obrigatórios com ciclo de vida envolvendo hospedeiros invertebrados e vertebrados (DUMLER et al., 2001).

A *E. canis* é um microrganismo Gram-negativo, pequeno e pleomórfico, que se replica no citoplasma dos leucócitos circulantes do hospedeiro (CORREA; CORREA, 1992). A princípio, são observados no interior de monócitos e neutrófilos formando inclusões denominadas de mórula. As mórulas medem cerca de 1.0 a 6.0  $\mu\text{m}$  de largura e

contém de 1 a 40 organismos. Ao deixar a célula sem rompê-la, cada corpúsculo contido no interior da mórula irá infectar uma nova célula (ANDEREG; PASSOS, 1999).

Inicialmente, as erliquiais eram classificadas de acordo com a célula sanguínea comumente infectada, por exemplo, as espécies dentro do gênero *Ehrlichia* foram divididas em formas monocíticas (*E. canis* e *E. risticii*), granulocíticas (*E. ewingii* e *E. equi*) e trombocíticas (*A. platys*), entretanto este tipo de classificação foi considerada imprópria porque a mesma espécie de *Ehrlichia* pode ser encontrada em outras células que não a sua principal célula-alvo (COHN, 2003; USA, 2012).

O uso de métodos moleculares, tais como a reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de sequenciamentos genéticos de espécies encontradas em várias regiões do mundo, permitiu novos agrupamentos e classificações taxonômicas das erliquias. Atualmente, três genogrupos distintos do gênero *Ehrlichia* são identificados com base nas similaridades do gene 16S rRNA. Conforme a reclassificação, o genogrupo 1 manteve o nome genérico *Ehrlichia*, os membros do genogrupo 2 passaram a se chamar *Anaplasma*, e do genogrupo 3 tornaram-se *Neorickettsia* (DUMLER et al., 2001).

Dumler et al. (2001), incorporando informações de biologia molecular referentes aos genes 16S rRNA e groESL, reclassificaram a família Anaplasmataceae. Algumas espécies foram transferidas para o gênero *Anaplasma*: *Anaplasma platys* (antiga *E. platys*), *A. phagocytophilum* (junção entre *E. equi* e *E. phagocytophila*), *A. bovis* (antiga *E. bovis*); outras para o gênero *Neorickettsia*: *Neorickettsia risticii* (antiga *E. risticii*) e *N. sennetsu* (antiga *E. sennetsu*). Por outro lado, a espécie *Cowdria ruminantium* foi inserida no gênero *Ehrlichia*, passando a ser *E. ruminantium*. Atualmente, o gênero *Ehrlichia* contempla seis espécies: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. ruminantium* (Tabela 1). Uma sexta espécie foi identificada por Kawahara et al. (2004) no Japão, isolada de carrapatos *Ixodes ovatus*, sendo designada como *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*

Tabela 1. Esquema de classificação antiga e atual das principais espécies do gênero *Ehrlichia*, *Anaplasma* e *Neorickettsia* e suas respectivas células alvos e hospedeiros.

<b>Classificação antiga</b>	<b>Classificação atual</b>	<b>Células-alvo</b>	<b>Hospedeiros principais</b>
<b>Genogrupo I</b>			
<i>Ehrlichia canis</i>	<i>Ehrlichia canis</i>	Mononucleares	Caninos
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	Mononucleares	Humanos
<i>Ehrlichia ewingii</i>	<i>Ehrlichia ewingii</i>	Granulócitos	Caninos
<i>Cowdria ruminantium</i>	<i>Ehrlichia ruminantium</i>	Endoteliais	Ruminantes
<b>Genogrupo II</b>			
<i>Ehrlichia phagocytophila</i>	<i>Anaplasma phagocytophila</i>	Granulócitos	Ruminantes
<i>Ehrlichia equi</i>	<i>Anaplasma phagocytophila</i>	Granulócitos	Equídeos
<i>Erliquiose Granulocítica Humana (EGH)</i>	<i>Anaplasma phagocytophila</i>	Granulócitos	Humanos
<i>Ehrlichia platys</i>	<i>Anaplasma platys</i>	Plaquetas	Caninos
<b>Genogrupo III</b>			
<i>Ehrlichia sennetsu</i>	<i>Neorickettsia sennetsu</i>	Mononucleares	Humanos
<i>Ehrlichia risticii</i>	<i>Neorickettsia risticii</i>	Mononucleares	Equídeos
<i>Neorickettsia helminthoeca</i>	<i>Neorickettsia helminthoeca</i>	Mononucleares	Cães

Fonte: Dagnone et al. (2001).

### 2.3 Importância em Saúde Pública

A erliquiose tem sido motivo de grande interesse tanto para pesquisas em medicina veterinária quanto para saúde pública, em decorrência das recentes descobertas de infecção em humanos (STICH et al., 2008). A infecção no homem é conhecida como febre da carraça, e ocorre se o mesmo for picado por um carrapato portador, e não pelo simples contato com o cão infectado. Os organismos causadores de erliquiose humana são visualmente indistinguíveis das espécies que acometem os animais (INOKUMA et al., 2005).

A erliquiose humana apresenta-se como uma febre aguda causada pela infecção de organismos intimamente relacionados com o gênero *Ehrlichia* e *Anaplasma*. Até o



momento, pelo menos cinco agentes da família Anaplasmataceae foram descritos infectando humanos, incluindo a *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Neorickettsia sennetsu* (BAKKEN; DUMLER, 2006).

A erliquiose monocítica humana (EMH) causada pela *E. chaffeensis*, descrita em 1986 nos EUA, é transmitida ao homem pelo *Amblyoma americanum*, infectando, preferencialmente, monócitos e macrófagos. Em 1994, também nos EUA, foi descrito o primeiro relato de erliquiose granulocítica humana (EGH) em decorrência da infecção por *A. phagocytophilum*, transmitida por carrapatos *Ixodes scapularis* e *I. ricinus*.

Notavelmente, EGH tem sido relatada em todo o mundo, com o reconhecimento da doença clínica em pelo menos 14 diferentes países da Europa e, provavelmente na China, Sibéria, Rússia e Coreia (PADDOCK; CHILDS, 2003). Na América do Sul são descritos casos de erliquiose humana na Venezuela, por *E. canis* e *E. chaffeensis*, através da pesquisa de anticorpos e caracterização molecular dos agentes (PEREZ et al., 2006), além de evidências sorológicas na Argentina e no Chile (RIPOLL et al., 1999; LÓPEZ et al., 2003). No Brasil, há a descrição de casos suspeitos de erliquiose em pacientes no Estado de Minas Gerais e o recente diagnóstico molecular dos primeiros casos de erliquiose humana no Estado de São Paulo (CALIC et al., 2004; COSTA et al., 2006; ANGERAMI et al., 2006).

Sabe-se que o agente causador da EGH também pode infectar naturalmente várias espécies animais. Da mesma forma, a erliquiose monocítica canina pode ser patogênica para seres humanos. Casos fatais ocorrem em aproximadamente 5% dos pacientes humanos com erliquiose monocítica (*E. chaffeensis*) e em 10% daqueles com a erliquiose granulocítica (DUMLER et al., 1995).

Apesar de diferentes agentes etiológicos nos casos de EMH e EGH, as manifestações clínicas e laboratoriais são similares e caracterizadas por febre alta, cefaleia, mialgia e mal-estar. O quadro clínico de erliquiose humana não é suficientemente característico para permitir um diagnóstico, pelo contrário, suas manifestações são facilmente confundíveis com outras doenças infecciosas como a Febre Maculosa (PADDOCK; CHILDS 2003).

A ocorrência de carrapatos *R. sanguineus* parasitando humanos no Brasil serve para alertar para o risco da transmissão de cada patógenos (*A. platys* e *E. canis*) para humanos (DANTAS-TORRES et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 1999; RAMOS et al., 2009).

Os únicos agentes que tem sido descritos causando doenças em humanos no Brasil são *R. rickettsii* (ANGERAMI et al., 2006) e *R. parkeri* (SPOLIDORIO et al., 2010). *R. amblyommii* é considerado um potencial patógeno para humanos, baseado em evidências sorológicas de doenças humanas causadas por este agente nos Estados Unidos (APPERSON et al., 2008). Ainda nada se conhece sobre a patogenicidade do *R. rhipicephali* e *R. bellii* em humanos. Finalmente, a infecção humana por *E. canis* tem sido relatada na Venezuela, onde provavelmente os agentes vetores foram o *R. sanguineus* (UNVER et al., 2001). Em adição, um diferente agente erliquial de patogenicidade desconhecida para humanos foi recentemente relatado infectando carrapatos *Amblyomma* no sul do Pantanal do Brasil (MELO et al., 2011).

## 2.4 Aspectos Epidemiológicos

A EMC tem sido relatada em todo o mundo, especialmente em áreas tropicais e subtropicais, causando alta morbidade e mortalidade (BIRCHARD; SHERDING, 2003). Fatores epidemiológicos relacionados às condições climáticas, distribuição do vetor, população em estudo, comportamento animal e habitat e a metodologia empregada na investigação do agente podem influenciar os níveis de prevalência da erliquiose canina no Brasil (DAGNONE et al., 2001). A incidência da doença é mais comum nos meses mais quentes onde há um maior desenvolvimento do carrapato, podendo ser diagnosticada durante todo o ano.

Segundo Bulla (2004), não existe uma predileção etária para a erliquiose, porém algumas raças são mais susceptíveis à doença, incluindo aquelas que vivem em áreas endêmicas e as que são transportadas para estas regiões (RIKIHISA et al., 1994; DAGNONE et al., 2001; MYLONAKIS et al., 2004). Segundo Nyindo et al. (1980), o pastor alemão apresenta uma maior suscetibilidade, mostrando a forma mais severa da doença com alta morbidade e mortalidade quando comparada a outras raças. Não tem sido estabelecido predileção a idade ou gênero. Contudo, vários outros trabalhos tem demonstrado uma correlação entre idade e a soropositividade para *E. canis*. (COSTA Jr et al., 2007; WATANABE et al., 2004; RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2005). Em relação a associação de sexo ou raça, Watanabe et al. (2004) e Rodriguez-Vivas et al., (2005) não encontraram nenhuma correlação. Sainz et al. (1996) não relataram diferenças entre raças,

entretanto houve associação entre a ocupação do cão (cão de guarda ou cão guia) e soropositividade para *E. canis*.

Manifestações da doença podem ser afetadas pela patogenicidade de diferentes cepas de *E. canis* e co-infecções com outros patógenos como *B. canis* e *Hepatozoon canis*, transmitidas pelo mesmo vetor (GAL et al., 2008).

Em zona rural, poucos estudos têm sido realizados e a epidemiologia da erliquiose canina é pouco conhecida. Em áreas rurais dos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais, foi observada uma prevalência de 4,8 e 5,94%, respectivamente, por meio de esfregaços sanguíneos (RODRIGUES et al., 2004). Porém, esta prevalência provavelmente está subestimada, já que poucos cães com infecção aguda de *E. canis* apresentam mórulas em esfregaços sanguíneos (WOODY; HOSKINS, 1991). Em Monte Negro (Rondônia), a prevalência foi de 37,9% em cães urbanos e 24,8% em cães rurais, a partir da técnica da RIFI (AGUIAR et al., 2006). Sainz et al. (1996) e Dagnone et al. (2002) observaram que cães que habitavam área urbana periférica ou rural tinham maiores riscos de infecção por *E. canis*. De acordo com Carlos et al. (2007), o ambiente rural apresenta maior risco de infecção, pois a situação socioeconômica dificulta o controle do vetor e os cães são facilmente infestados por carrapatos.

A EMC ocorre em, aproximadamente, 20% dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias em vários estados do Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil (MACHADO, 2004). A maior prevalência observada é na região Nordeste (43%) e a menor na região Sul do país (1,70%) (BRITO, 2006). Algumas pesquisas demonstram que a maioria dos cães atendidos em hospitais e clínicas veterinárias apresentam anticorpos anti- *E. canis* e/ou DNA de *E. canis* quando avaliados pela PCR (DAGNONE et al., 2003, BULLA et al., 2004).

Nos últimos anos, vários estudos demonstraram a ocorrência da doença em diferentes regiões do Brasil. Os métodos diagnósticos usados, as regiões e populações estudadas, cães urbanos e rurais, sadios e doentes, variam, mas independente destes fatores, a EMC ocorre, sendo realmente considerada importante enfermidade canina (RIECK, 2011). Vieira et al. (2011) enfatizaram que, mesmo assim, em algumas regiões a situação da EMC é ainda desconhecida, sobretudo porque a maioria dos estudos com *E. canis* em cães refere-se a populações atendidas em hospitais veterinários ou infecções experimentais.

No Brasil, há relatos de várias espécies de carrapatos parasitando os cães, no entanto, a ocorrência dessas espécies é resultante das características epidemiológicas particulares de cada região e do ambiente em que são criados. Segundo Labruna e Pereira (2001), em cães criados em ambientes urbanos, são encontrados, na grande maioria, carrapatos da espécie *R. sanguineus*. Já os cães criados em áreas rurais ou suburbanas, podem ser infestados por várias espécies de carrapatos, pertencentes ao gênero *Amblyoma*.

No Brasil, a primeira ocorrência de erliquiose em felinos foi relatada em 1998 que observaram a presença de mórulas em leucócitos mono e polimorfonucleares em esfregaço sanguíneo de um felino doméstico com achados clínico-laboratoriais sugestivos de erliquiose felina (ALMOSNY et al., 1998). Há relatos também de detecção de anticorpos para *E. canis* em um puma de vida livre (FILONI et al., 2006). Recentemente, Oliveira et al. (2009) amplificaram *E. canis* em três gatos domésticos em Viçosa. Em felídeos silvestres criados em cativeiros de zoológicos brasileiros André et al. (2010) detectaram anticorpos e DNA de *E. canis*, esclarecendo que maiores estudos sobre a transmissão devem ser realizados, bem como sobre a forma que esta doença se desenvolve nestes animais.

Na erliquiose monocítica canina, a transmissão ocorre através da secreção salivar do carrapato ixodídeo (UENO, 2009). A transmissão entre animais se faz pela inoculação de sangue proveniente de um cão contaminado para um cão sadio, através da picada do carrapato (BIRCHARD & SHERDING, 2003).

Os cães são o hospedeiro natural do *R. sanguineus* e o único animal importante na manutenção da população no ambiente (OYAFUSO et al., 2002). Esse artrópode habita ambientes urbanos e tem hábitos nidícolas, vivendo em tocas, ninhos, e até mesmo em esconderijos nos canis. Preferem se fixar nas regiões do pescoço, orelhas, espaços interdigitais e dorso. Uma vez ingurgitadas, as fêmeas se desprendem do hospedeiro para o ambiente, onde procuram locais escondidos, com temperaturas mais frescas e umidade elevada (embaixo de coberturas vegetais, frestas, etc.), onde irão colocar milhares de ovos dando início a uma nova geração. Ao término da postura, as fêmeas morrem, encerrando uma geração de carrapatos. De cada ovo colocado, nasce uma larva, iniciando-se um novo ciclo (SÃO PAULO, 2004).

Os hospedeiros vertebrados mais comuns são os da família *Canidae* (cães, coiotes, raposa e chacal). Cães em áreas endêmicas e aqueles que são transportados para estas regiões são susceptíveis à doença. Canídeos selvagens podem atuar como

reservatórios da *E. canis*, tendo sido demonstrada infecção natural em um chagal (*Lycan pictus*), e experimental em um coiote, com *E. canis* e *B. canis* (ALMOSNY, 2002). Segundo Dawson et al. (1991), a mórula da *Rickettsia* responsável pela erliquiose humana nos EUA, assemelha-se bastante àquelas vistas em células infectadas por *E. canis*.

## 2.5 Patogenia e Sinais Clínicos

Três principais espécies estão envolvidas na ocorrência da erliquiose canina: a *E. canis*, que parasita monócitos e causa a doença com maior severidade (Erliquiose Monocítica Canina), a *E. ewingii* que infecta granulócitos e produz uma infecção subclínica (Erliquiose Granulocítica Canina) e a *A. platys* que se multiplica apenas em plaquetas de cães causando a trombocitopenia cíclica canina (BOOL; STMOLLER, 1957).

Ao contrário das demais riquetsias, as erlíquias se replicam dentro de fagossomos da célula hospedeira. As células infectadas são transportadas especialmente ao pulmão, rins e meninges, aderindo ao endotélio vascular e induzindo o aparecimento de vasculite e infecção do tecido subendotelial (SIMPSON, 1974). Os efeitos da *E. canis* na circulação são acompanhados pela supressão e/ou destruição da medula óssea, que pode ser grave ou não, dependendo do estágio da doença (WANER et al., 1995).

A bactéria passa por um período de incubação de uma a três semanas passando, em seguida, aos três estágios da doença: fase aguda (início da infecção), subclínica (geralmente assintomática) e crônica (nas infecções persistentes) (STADES, 1999; TILLEY; SMITH, 2003).

A fase aguda é iniciada com um processo de hipertermia, após incubação de 5 a 15 dias, variando entre os animais a intensidade do pico febril, assim como também a gravidade dos sinais (ALMOSNY, 2002). Nesta fase o microrganismo entra nas células mononucleares, se replica por fissão binária, antes de se disseminar para outros órgãos do hospedeiro. Os sinais clínicos são inespecíficos incluindo febre, secreção ocular e nasal, anorexia, depressão, perda de peso, linfadenopatia, vasculite, tremores musculares e poliartrite (BELLAH et al., 1986). Os achados laboratoriais mais comuns são trombocitopenia e leucopenia. A trombocitopenia na fase aguda pode ocorrer por aumento no consumo de plaquetas pelo endotélio vascular inflamado, por aumento no sequestro esplênico, destruição imunomediada ou ainda por diminuição da vida média das plaquetas. Ocorre também alteração na função das plaquetas, com muitos animais apresentando

sangramento superficial, mesmo com o número de plaquetas e perfil de coagulação normais (ALMOSNY, 2002). Após a fase aguda o animal pode se curar, ou entrar na fase subclínica, onde os sinais clínicos desaparecem, mas a bactéria se mantém no organismo. Esta fase pode persistir por anos (NYINDO et al., 1980; WANER et al., 1997).

Na fase subclínica, são observados elevados títulos de anticorpos, com alterações hematológicas mais discretas (ANDEREG; PASSOS, 1999; NAKAGHI et al., 2008). Estudos relatam que cerca de 50% dos cães que desenvolvem a fase subclínica, a anemia regride e a contagem de plaquetas retorna ao valor normal (ALMOSNY, 2002). Algumas complicações podem ser encontradas nesta fase como depressão, hemorragias, edema de membros, perda de apetite, palidez de mucosas, uveíte e cegueira (WOODY; HOSKINS, 1991). Em cães infectados experimentalmente, o achado laboratorial mais frequente na infecção erliquial subclínica foi trombocitopenia, associada com altos títulos de anticorpos contra *E. canis* (WANER et al., 1997). Cães imunocompetentes eliminarão o parasita (HIBBLER et al., 1986), enquanto que os cães com resposta imunológica insuficiente entrarão na fase crônica da doença.

A fase crônica pode variar de leve a severa. Na severa, ocorre comprometimento da medula óssea com pancitopenia (WALKER et al., 1970); óbito por hemorragias secundárias à trombocitopenia, trombocitopatias (HARRUS, 1999) ou infecções secundárias (HUXSOLL et al., 1970). Os sintomas mais comuns da fase crônica são depressão, apatia, perda de peso crônica e emaciação, mucosas pálidas, febre, edema periférico, equimoses e epistaxe, podendo ocorrer infecções secundárias como pneumonia, glomerulonefrite, insuficiência renal, artrite, polimiosite e ataxia (HARRUS et al., 1997). Os achados hematológicos na fase crônica são similares aos da fase aguda sendo observados monocitose, linfocitose e trombocitopenia persistente associados à anemia arregenerativa (ALMOSNY, 2002). A trombocitopenia é o achado mais frequente em cães experimentalmente e naturalmente infectados (OLIVEIRA et al., 2000), estando associada principalmente à fase crônica devido ao decréscimo da hematopoiese, que ocorre por carência de megacariócitos (ALMOSNY, 2002). Nesta fase a leucopenia está presente e a pancitopenia pode ocorrer em casos avançados, devido à hipoplasia de todas as células precursoras (ALMOSNY, 2002).

A co-infecção com mais de uma espécie erliquial ou com outros hemoparasitas é comum (RAMOS et al. 2009). Infecções simultâneas com vários patógenos transmitidos por carrapatos são possíveis e podem contribuir para o quadro clínico inespecífico em cães

(EWING et al., 1971). De acordo com Gaunt et al. (2010), infecções simultâneas ou subsequentes de *A. platys* e *E. canis* podem causar mudanças hematológicas, bem como alterar a resposta imune do hospedeiro.

Devido à característica de localização intracelular, esses microrganismos dificultam a atuação do sistema imune e a resposta humoral torna-se ineficiente. A defesa do organismo depende quase que exclusivamente da resposta celular para eliminação do agente (HARRUS et al., 1997). Sugere-se que a resposta imune humoral não possui um papel importante na defesa do organismo contra essas infecções, ao contrário, hipóteses indicam que ela possa contribuir para a patogênese da doença já que a grande produção de anticorpos pode gerar deposição de imunocomplexos (HILDEBRANDT et al., 1973; HARRUS et al., 1996).

Em determinadas fases da infecção, quando as amostras sanguíneas têm resultados negativos de PCR, é possível detectar os organismos em outros locais. A evasão da circulação tem como objetivo evitar a resposta imune. Estudos recentes sugerem que as espécies do gênero *Ehrlichia* migram para tecidos conectivos densos (fáscias e seus músculos). Outra hipótese é que, mesmo que formas granulocíticas sejam mais comumente observadas em granulócitos, elas persistam em células mononucleares de vida longa (EGENVALL et al., 2000).

## **2.6 Diagnóstico**

Muitos são os métodos utilizados para o diagnóstico da EMC, tais como, o exame clínico, hemograma e avaliação direta pela observação de mórulas em leucócitos, contudo técnicas mais sofisticadas e que apresentam maior especificidade e sensibilidade tem sido implementadas para uma maior precisão no diagnóstico, são eles: métodos indiretos através da pesquisa de anticorpos e as técnicas moleculares através da amplificação do DNA e o isolamento em cultivo celular. Melhorias nas técnicas de diagnóstico, bem como conhecimento sobre a doença e a expansão geográfica da sua ocorrência possibilitaram o aumento da identificação de casos (RIECK, 2011).

### 2.6.1 Hematologia e avaliação do esfregaço sanguíneo

A contagem de células sanguíneas é um constituinte essencial no diagnóstico da EMC. Na fase aguda, trombocitopenia moderada a severa é um achado hematológico distinto. A avaliação, no esfregaço sanguíneo, do número de plaquetas é essencial para confirmar a presença real da trombocitopenia, a qual, na fase aguda, é geralmente acompanhada de leve anemia e discreta redução das células brancas (HARRUS; WANER, 2011).

Durante a fase subclínica uma leve trombocitopenia pode estar presente. A contagem de leucócitos e eritrócitos também pode estar reduzida, embora estas mudanças possam ser relativamente leves e dificultar sua percepção (WANER et al., 1997). Alguns cães entram na fase crônica da doença com uma trombocitopenia geralmente severa e acompanhada por uma marcada anemia e leucopenia. A pancitopenia, em decorrência da hipoplasia da medula óssea, é a principal característica da forma crônica mais severa (HARRUS et al., 1997).

Segundo Hildebrandt (1973), a demonstração de uma típica mórula intracitoplasmática em monócitos praticamente define o diagnóstico da EMC, contudo, atualmente sabe-se que esta técnica não apresenta muita confiabilidade. A detecção de inclusões podem ajudar no diagnóstico de infecções agudas de EMC, entretanto, a diversidade de cores, formas e tamanhos encontradas nestas inclusões requerem muita atenção e devem ser acompanhadas por outras técnicas de diagnóstico, tais como a sorologia e/ou técnicas moleculares (DAGNONE et al., 2009).

Para a pesquisa de mórulas deve-se realizar esfregaço sanguíneo, de preferência da borda da orelha, o mesmo deve ser fixado em álcool metílico e depois corado. Este método é considerado pouco eficaz, apresentando cerca de 5% de positividade (ANDEREG; PASSOS, 1999).

A busca por mórulas é difícil e demanda muito tempo, apresentando sucesso em apenas 4% dos casos (WOODY; HOSKINS, 1991), sendo observadas principalmente durante a fase aguda da infecção. A evidenciação de mórulas também é possível em esfregaços corados de punção aspirativa de medula óssea em cães natural e experimentalmente infectados (MOREIRA et al., 2003). Dificilmente, as mórulas são encontradas em esfregaços sanguíneos corados com May-Grunwald-Giemsa (MGG) (NAKAGHI et al., 2008; RAMOS et al., 2009). A maior parte das inclusões



citoplasmáticas permanece circulante por apenas três dias, dificultando o diagnóstico (EGENVALL et al., 1997).

As espécies de erlíquias são encontradas em granulócitos ou em plaquetas dos esfregaços sanguíneos de animais nos estágios iniciais da doença. Aquelas espécies que têm por alvo monócitos estão presentes com menor frequência nos esfregaços sanguíneos (BREITSCHWERDTET al., 1998).

Plaquetas, grânulos linfocíticos azurofílicos e material nuclear fagocitado podem ser confundidos com inclusões erliquiais. Entretanto, outros organismos erliquiais pertencentes a família Anaplasmatacea (*E. chaffeensis*, *N. risticii* e *E. ruminantium*) também podem infectar monócitos caninos (BREITSCHWERDTET al., 1998). Dados epidemiológicos de prevalência de patógenos erliquiais e seus vetores para determinada região geográfica é que poderão indicar quais diagnósticos diferenciais podem ser relevantes e dentre eles quais deverão ser considerados para a área em particular (HARRUS; WANER, 2011).

### **2.6.2 Bioquímica**

De acordo com Dagnone et al. (2003), hiperproteinemia, primariamente resultante da elevação das globulinas, é comumente detectada uma a três semanas após o início da infecção. Essa hiperglobulinemia geralmente persiste por um mínimo de 6 a 18 meses após o microrganismo ser eliminado através da terapia adequada (GREENE; HARVEY, 1984). Hipoalbuminemia concomitante é frequentemente observada e pode ser causada por diversos fatores tais como: redução da ingestão proteica, perda de sangue, perda proteica periférica devido a fluidos inflamatórios edematosos resultantes de vasculite, redução da produção de proteínas devido hepatopatias concomitantes e proteinúria devido à glomerulonefrite por deposição de imunocomplexos (WOODY; HOSKINS, 1991).

Eletroforese das proteínas do soro podem evidenciar hiperglobulinemia policlonal e gamaglobulinas nas fases crônicas da infecção, mas gamopatias monoclonais também podem ocorrer. Hiperviscosidade sérica foi identificada em animais com erliquiose crônica (HARRUS et al., 1996). A hipoalbuminemia observada em todas as fases da doença pode agir como mecanismo compensatório para a hiperglobulinemia, a fim de manter a pressão oncótica e evitar o aumento da viscosidade do sangue (WOODY; HOSKINS, 1991).

Nos estágios iniciais da doença, geralmente aparecem proteínas de fase aguda, conforme foi evidenciado por alterações iniciais em alfa globulinas (BURGUEN et al., 1971). Elevações da alanina amino transferase (ALT) e fosfatase alcalina (FAL) geralmente ocorrem e podem estar acompanhadas de hiperbilirrubinemia moderada, hiperfosfatemia e azotemia (WOODY; HOSKINS, 1991).

### 2.6.3 Sorologia

A infecção por *E. canis* resulta no desenvolvimento de anticorpos específicos, que podem ser observados na circulação sanguínea 7 dias (IgM) a 15 dias (IgG) após a infecção (WANER et al., 2001). Inicialmente os títulos de IgG são relativamente baixos, mas à medida que a infecção progride, o aumento do título é evidente. Os cães que se recuperam da fase aguda ou aqueles que recebem inadequado tratamento progridem para a fase da infecção inaparente (HARRUS et al., 1997). Portanto, altos títulos de anticorpos em cães aparentemente normais pode indicar persistência da infecção e estímulo antigênico crônico (WANER et al., 2001).

Vários métodos sorológicos têm sido desenvolvidos para o diagnóstico da EMC e são considerados ferramentas valiosas. A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para anticorpos IgG anti - *E. canis* é o teste sorológico “padrão ouro”, indicando exposição para *E. canis*. A IgM não é considerada um indicador real de exposição devido ao desenvolvimento inconsistente de IgM no curso da doença (MCBRIDE et al., 2003).

Sabe-se que as várias espécies de erlíquias apresentam antígenos em comum, gerando reações cruzadas. Dessa forma, são requeridas interpretações cuidadosas e correlação dos testes diagnósticos com achados clínicos e epidemiológicos para evitar designação incorreta do agente em questão. Em áreas endêmicas, cães podem apresentar um alto título de IgG para *E. canis* sem demonstrar a doença clinicamente, causando um aumento no número de falso-positivos nessas regiões (BULLA et al., 2004).

Anticorpos contra vários outros organismos que apresentam reação cruzada com *E. canis* complicam o diagnóstico sorológico da EMC (WANER et al., 2001). A exposição para cada espécie deve ser considerada na luz da área geográfica residencial e histórico de viagens do cão suspeito. Anticorpos contra *E. canis* são conhecidos para reagir cruzado com antígenos de *N. helminthoeca* e *N. risticii*, e reciprocamente anticorpos caninos para

*N. helminthoeca* apresentam reação cruzada com antígenos de *E. canis* (RIKIHISA, 1991). A RIFI não pode discriminar entre anticorpos de *E. canis*, *E. ewingii*, *E. chaffeensis* e *E. ruminantium* (CARDENAS et al., 2007). Reação cruzada entre anticorpos *E. canis* e antígeno de *A. phagocytophilum* também tem sido documentados ao longo do tempo.

A principal desvantagem dos métodos sorológicos é a dificuldade de distinguir uma infecção atual de uma exposição prévia. A interpretação dos resultados de exames sorológicos deve considerar o curso da doença, a reatividade cruzada com outras espécies de *Ehrlichia*, infecções múltiplas com outros agentes transmitidos por carrapatos e, também, títulos de anticorpos persistentes após o tratamento.

Existe ainda uma considerável variação entre laboratórios em relação à interpretação de títulos sorológicos (SHAW et al., 2001). Títulos de IgG 1:40 são considerados positivos para a exposição a *E. canis*. Para infecções agudas, são recomendados dois testes consecutivos, com intervalo de 7-14 dias, um aumento de 4 vezes em títulos de anticorpos é sugestivo de uma infecção ativa. Anticorpos IgG anti - *Ehrlichia* persistem por vários meses após o tratamento e eliminação da bactéria (HARRUS; WANER, 2011).

A RIFI tem sido amplamente utilizada para o monitoramento da terapia anti - *E. canis*. Na maioria dos cães, o título de anticorpos declina rapidamente e geralmente se torna negativo 6 a 9 meses após a terapia. Pode também possibilitar o reconhecimento da reinfeção, que se traduz na rápida ascensão do título de anticorpos (MANOEL, 2010).

O teste ELISA comercialmente disponível (recombinant major antigenic protein 2 (rMAP2)-ELISA, the Immunocomb® (Biogal, Israel) and the Snap® 3Dx assay (IDEXX Laboratories Inc., USA), por se tratar de um teste qualitativo, sinaliza apenas infecção presente ou passada, não permitindo avaliar a ascensão ou o declínio dos anticorpos. Em baixos títulos, não existe correlação entre a reação de RIFI e a positividade ao teste ELISA comercial, indicando a maior sensibilidade do primeiro (O'CONNOR et al., 2006; HARRUS et al., 2002).

O Western blotting é uma técnica mais específica e pode ajudar a caracterizar o agente infeccioso através das “impressões digitais” do perfil da proteína imunogênica. Essa técnica tem sido utilizada para caracterizar e distinguir entre infecções com diferentes organismos causadores de erliquioses, anaplasmoses ou neoriquetsioses e tem potencial para resolver dilemas envolvendo reações cruzadas. Apresentando sensibilidade comparável à RIFI, possui vantagens na objetividade da leitura, pois não sofre influência

da subjetividade do operador, como ocorre na imunofluorescência, porém, a desvantagem é ser uma técnica de elevado custo e necessitar de um maior tempo na realização, além de requerer tecnologia mais avançada (ANDEREG; PASSOS, 1999).

Resultados conflitantes entre RIFI, ELISA e Western blotting foram observados em amostras de soros de baixos títulos, e estes resultados podem refletir alta sensibilidade e baixa especificidade da RIFI associadas com reação-cruzada entre agentes do gênero *Ehrlichia* (O'CONNOR et al., 2006).

#### **2.6.4 Cultivo celular**

No Brasil, a *E. canis* foi isolada do sangue de cães infectados em linhagem de células DH82 de casos provenientes do Rio de Janeiro (TORRES et al., 2002), Jaboticabal (AGUIAR et al., 2007), São Paulo (AGUIAR; HAGIWARA; LABRUNA, 2008), Cuiabá, Londrina, Monte Negro e Presidente Prudente (AGUIAR; ORLANDELLI, 2009) e Uberlândia (ALVES, 2010).

Estudos recentes demonstraram que as espécies monocíticas de *Ehrlichia* podem ser cultivadas em linhagens celulares oriundas de seus hospedeiros naturais ou em linhagens de células de outros mamíferos. A partir de células de um cão com histiocitose maligna, foi estabelecida a linhagem contínua de células caninas DH82 (cepa Oklahoma). Keysary et al. (2001) testaram com sucesso a adaptação da cepa Israeli em uma linhagem contínua de macrófagos de camundongos (1774.AI).

O cultivo celular visa amplificar o número de corpúsculos erliquiais em um espaço de tempo relativamente curto (MUTANI; KAMINJOLO, 2001). Entretanto, na rotina clínica, o isolamento por cultivo é laborioso e impraticável nos laboratórios de microbiologia clínica, pois leva de 14 a 34 dias para fornecer resultados, além de apresentar um alto custo e requerer ambientes e técnicas apropriadas (IQBAL et al., 1994).

Para o sucesso do cultivo devem ser levados em consideração alguns pré-requisitos, tais como: o estágio de infecção em que se encontra o animal, a presença de linhagens de células específicas ou a necessidade de lavagens peritoniais repetidas, a fim de se obter as células infectadas. Tanto os macrófagos peritoniais como os monócitos circulantes de cães são igualmente susceptíveis à infecção por *E. canis*. As células

infectadas podem ser detectadas 60 horas após a inoculação, e a replicação se torna evidente dos 12 aos 18 dias (STEPHENSON; OSTERMAN, 1977).

### 2.6.5 Detecção molecular

A introdução de técnicas moleculares para a detecção de *E. canis* tem permitido um diagnóstico rápido, sensível e específico para a erliquiose, nas fases aguda e crônica da doença.

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) é capaz de diferenciar as espécies de *Ehrlichia* pela identificação de sequências específicas no DNA da bactéria. A técnica pode ser realizada com vários genes alvo (16S rRNA, p28, p30, dsb, VirB9), entretanto o teste de PCR para os genes 16S rRNA e p30 são os mais comumente usados. O fato de que *E. canis* contém múltiplas cópias do gene p30, mas somente uma cópia do gene 16S rRNA, aumenta as chances para a detecção do patógeno quando o alvo é o primeiro (STICH et al., 2008).

A realização de uma PCR, amplificando DNA comum a todas as espécies de *Ehrlichia spp.*, seguida por sequenciamento, é uma ferramenta útil para o estudo epidemiológico da infecção erliquial em carrapatos e vertebrados (INOKUMA et al., 2001). Sempre que possível, fragmentos amplificados pela PCR devem ser sequenciados para confirmar os resultados e diferenciar espécies de *Ehrlichia*, particularmente quando a PCR é aplicada a amostras derivadas de outros animais que não cães (HANCOCK et al., 2001).

A PCR convencional é um método que possui alta especificidade e sensibilidade, mas possui algumas limitações como: a possibilidade de contaminação com o brometo de etídio no processamento pós amplificação, os resultados não são quantitativos e a discriminação é baseada apenas no tamanho do fragmento. Além da possibilidade de ocorrer resultados falso-positivos, ocasionados por contaminação do ambiente de trabalho por DNA amplificado em virtude da alta sensibilidade do método. Estas restrições podem ser minimizadas ou até mesmo evitadas com o uso da técnica de PCR em Tempo Real (DO CARMO & FIORINI, 2007).

Outras técnicas derivadas da PCR têm sido desenvolvidas com o objetivo de aumentar a sensibilidade desta metodologia, como por exemplo a nested PCR (nPCR),

RFLP-PCR (restriction fragment length polymorphism) e real time PCR (MURPHY et al., 1998; WEN et al., 1997; LABRUNA et al., 2007).

Na nPCR utiliza-se como DNA molde o produto oriundo de uma primeira reação, obtendo assim, um fragmento menor que o da primeira amplificação. Alguns trabalhos ressaltam que a utilização da nested-PCR aumenta a sensibilidade da técnica (WEN et al., 1997; MURPHY et al., 1998). A técnica é muito sensível e específica para a detecção de *E. canis*, sendo útil para o diagnóstico laboratorial (MURPHY et al., 1998) e para verificação da eficácia *in vivo* de antibióticos contra essa infecção (WEN et al., 1997). A nPCR, em virtude da sua sensibilidade elevada, tem sido usado com frequência para a detecção de *E. canis*, (WEN et al., 1997; MURPHY et al., 1998; MACIEIRA et al., 2005; MYLONAKIS et al., 2009), porém, como é realizado em duas etapas, envolve custo e trabalho adicional e pode ser mais suscetível a falso-positivos como resultado de contaminação da primeira etapa.

Uma análise comparativa entre a PCR (gene *dsd*) e a nested-PCR (16S rRNA), realizada em 24 amostras de sangue de cães naturalmente infectados por *E. canis*, demonstrou que as duas técnicas são adequadas ao diagnóstico da EMC (MACHADO, 2004). As vantagens adicionais da PCR em etapa única são a redução de falso-positivos devido à contaminação por amplicons da primeira etapa e a diminuição no tempo de execução da técnica (ALVES et al., 2005).

A infecção concomitante de *E. canis* com outros hemoparasitos é frequente em regiões endêmicas. Dessa forma, buscando facilitar o diagnóstico das principais hemoparasitoses caninas, protocolos que detectam mais de um agente etiológico em uma mesma reação têm sido desenvolvidos. Kledmanee et al. (2009) desenvolveram um multiplex de PCR convencional capaz de realizar a detecção simultânea de *E. canis*, *Babesia* sp. e *Hepatozoon canis* em uma mesma amostra de sangue canino.

Infecções experimentais indicaram o baço como o local mais sensível para se detectar DNA de *E. canis* durante a fase subclínica da EMC, apoiando a hipótese de que os organismos são mais facilmente encontrados nos órgãos do que no sangue periférico. Entretanto, o estudo não avaliou cães na fase aguda nem no início da fase subclínica, fases estas em que se encontram em geral, os cães que recebem atendimento nos hospitais e clínicas veterinárias (HARRUS et al., 1998a). Gal et al. (2008) ressaltaram que informações comparativas, por PCR, sobre a propagação e a presença de *Ehrlichia canis* em diferentes órgãos são limitadas e se torna difícil devido: a) diferenças na infecção

natural e experimental, b) diferentes fases da doença, c) metodologia de amostragem, d) natureza dos tecidos avaliados.

A PCR em tempo real vem ganhando espaço nos diagnósticos clínicos e nos laboratórios de pesquisa por apresentar a capacidade de gerar resultados quantitativos, sendo também denominada PCR quantitativa (qPCR). Essa técnica permite o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida, em relação à PCR convencional (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004).

A qPCR é mais sensível do que a PCR convencional além de permitir a quantificação da carga bacteriana. Esta técnica de diagnóstico tem sido utilizada para quantificar a carga de *Ehrlichia* em cães infectados naturalmente e experimentalmente (BANETH et al., 2009). A probabilidade de contaminação na PCR em tempo real é menor do que a PCR convencional. Dessa forma, a qPCR vem se tornando rapidamente o método preferencial para o diagnóstico de *E. canis* (HARRUS; WANER, 2011).

A detecção de *E. canis* pelo PCR em tempo real torna-se interessante uma vez que esta técnica oferece rapidez de resultado, pois não requer a detecção em gel de eletroforese, necessário na análise da PCR convencional.

NOTOMI et al. (2000) desenvolveram a tecnologia da amplificação isotérmica de DNA, o LAMP (*Loop-Mediated Isothermal Amplification*), onde é possível amplificar sequências de DNA com grande especificidade. Em estudo desenvolvido por Chiari (2010), utilizou-se sequências específicas do gene *dsb* (disulfide bond) de *E. canis* como alvo e o mesmo mostrou-se altamente específico. Os testes revelaram uma incidência maior da doença do que aquela preconizada por autores que utilizam técnicas diagnósticas tradicionais. O LAMP mostrou-se mais sensível do que a PCR, e não foi necessária a extração do DNA, além disso, o produto da amplificação pode ser observado a olho nu. O experimento concluiu que a metodologia LAMP possibilita a identificação específica e com alta sensibilidade de animais infectados, com mínima estrutura laboratorial, viabilizando assim, sua utilização em clínicas, laboratórios e instituições de ensino.

## 2.7 Tratamento

Entre as drogas eficazes no tratamento para erliquioses, as tetraciclínas e seus derivados (oxitetraciclina, cloranfenicol, enrofloxacina, imidocarb e doxiciclina) estão entre as que têm maiores probabilidades de eliminar o agente (DOYLE et al., 2005) e são

utilizadas na terapia tanto de seres humanos como de animais. Dentre elas, a doxiciclina é considerada a droga de eleição no tratamento da erliquiose em todas as suas fases (NEER et al., 2002). O cloranfenicol é menos eficaz que as tetraciclina. A enrofloxacina não mostrou valor terapêutico no tratamento de infecção experimental por *E. canis* (NEER et al., 1999). O dipropionato de imidocarb é bastante eficaz no tratamento da erliquiose, principalmente em casos de co-infecção de duas ou mais erlíquias em cães ou com infecção concomitante por *Babesia spp.* (BREITSCHWERDT et al., 1998).

Na literatura existem várias indicações de dosagens e tempo de duração do tratamento da erliquiose utilizando-se a doxiciclina. Os critérios para o tratamento variam de acordo com a precocidade do diagnóstico, da severidade dos sintomas clínicos e da fase da doença que o paciente se encontra quando do início da terapia. Bartsch e Greene (1996) recomendam, nas fases agudas, a dosagem de 5 mg/kg duas vezes ao dia durante 7 a 10 dias e nos casos crônicos 10 mg/kg via oral durante 7 a 21 dias. Alguns autores recomendam prolongar o tratamento por mais de 6 (seis) semanas nos casos de erliquiose subclínica (HARRUS et al., 1997), caso contrário existe a possibilidade da permanência do agente no animal (IQBAL et al., 1994). Acredita-se que curtos tratamentos com doxiciclina sejam capazes de negativar a PCR de amostras sanguíneas, eliminando completamente os agentes causadores da infecção (BEAUFILS et al., 2002).

Além da antibioticoterapia, tratamentos de suporte devem ser adotados à medida que se fizerem necessários, principalmente em infecções crônicas ou que ameacem a vida do paciente (COHN, 2003). Assim, deve-se corrigir a desidratação com fluidoterapia e as hemorragias devem ser compensadas pela transfusão sanguínea. Terapia a base de glicocorticóides associados a antibióticos pode também ser utilizada nos casos em que a trombocitopenia for importante e nos casos de infecções bacterianas secundárias (ANDEREG; PASSOS, 1999).

O prognóstico depende da fase em que a doença for diagnosticada e do início da terapia. Quanto antes se inicia o tratamento nas fases agudas, melhor o prognóstico. Nos cães, no início da doença, observa-se melhora do quadro em 24 a 48 horas, após o início da terapia. Em alguns casos, a terapia de suporte inclui também vitaminas e esteróides anabólicos (WOODY; HOSKINS, 1991).

A utilização conjunta da detecção de anticorpos anti-*E. canis* pela RIFI e a detecção do agente pela PCR permitem uma avaliação diagnóstica mais precisa. Se os resultados obtidos em ambas as técnicas for positivo ou negativo, os cães são infectados ou



não infectados respectivamente. Se a RIFI for positiva e a PCR negativa, em cães sem alterações clínicas, seria recomendado retirar o tratamento antibiótico e repetir o teste após dois meses e, se os cães permanecem assintomáticos, os títulos de anticorpos diminuirão mais que 16 vezes e a PCR for negativa, o agente foi eliminado do organismo (WEN et al., 1997).

Nos casos em que a RIFI é negativa, mas a PCR positiva, o tratamento deve ser indicado mesmo sem alterações clínicas até que se torne negativa, pois a infecção pode estar presente (WEN et al., 1997). Cães tratados adequadamente podem permanecer soropositivos durante ou após o tratamento, sugerindo resposta humoral contínua (HARRUS et al., 1998b).

Animais tratados com sucesso podem se reinfectar (HARRUS; WANER, 2011). Em animais que se tornaram soronegativos também pode-se detectar erlíquias através da PCR em aspirado de baço (HARRUS, 1999).

## 2.8 Prevenção

A prevenção da doença tem um caráter de suma importância nos canis e nos locais de grande concentração de animais. Para tanto, produtos acaricidas ambientais e de uso tópico são eficazes desde que seja realizado o manejo correto.

Todo animal que entre em uma propriedade ou canil, deve ser mantido em quarentena e tratado para carrapatos. Caso seja positivo para *Ehrlichia sp.*, deverá ser tratado antes de ingressar na criação, sendo que nas áreas endêmicas, o fluxo de cães deve ser mínimo e quando ocorrer, recomenda-se tratar o animal com doxiciclina por um período de 1 mês (DAVOUST, 1993).

Woody e Hoskins (1991) propõem o tratamento de animais provenientes de áreas endêmicas de difícil controle de carrapatos, com doses terapêuticas de doxiciclina por mais de uma geração do carrapato transmissor, fazendo com que haja uma diminuição drástica das infecções erliquiais.

O controle da infestação por carrapato pode ser feito através de banhos de imersão. Ainda existem coleiras anti-pulga e anti-carrapatos que podem reduzir a reinfestação, mas ainda não se comprovou sua confiabilidade. Quando o animal é submetido a banhos de imersão, esses devem ser repetidos a cada 15 dias, em casos de

grandes infestações. Os produtos mais utilizados nestes banhos incluem os piretróides (TILLEY; SMITH, 2003)

A prevenção da erliquiose consiste basicamente no controle de carrapatos, pois até o momento nenhuma vacina eficaz foi desenvolvida (HARRUS; WANER, 2011).

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local de Execução**

O presente trabalho foi desenvolvido no município de Patos/PB. Os testes de diagnóstico foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido, da Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária no Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Patos – PB, no laboratório da Biogene Ind. & Co. Ltda, localizado na incubadora de empresas da Universidade Federal de Pernambuco, campus Recife e no Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Mato Grosso, campus de Cuiabá.

#### **3.2 Caracterização da Área**

O município de Patos está situado a uma altitude média de 242 m acima do nível do mar, distando em aproximadamente 300 km de João Pessoa, a capital do Estado. Apresenta clima semiárido, com área de 513 Km<sup>2</sup> e população de 100.674 habitantes. A temperatura média é de 32°C, umidade relativa média do ar de 55% e precipitação pluviométrica média anual de 700 mm e (IBGE, 2010).

#### **3.3 Análise Estatística**

##### **3.3.1 Amostragem**

Para o cálculo do número amostral foram considerados os parâmetros: (a) prevalência esperada; (b) erro absoluto e (c) nível de confiança, de acordo com a fórmula para amostras aleatórias simples (NOORDHUIZEN et al., 1997; THRUSFIELD, 1995):

$$n = Z^2 \times P(1 - P)/d^2$$

Onde:

n = número de animais a serem utilizados

Z = valor da distribuição normal para o nível de confiança de 95% → Z = 1,96

P = prevalência esperada → P = 50%

d = erro absoluto → d = 10%

### 3.3.2 Análise dos resultados

A análise dos fatores de risco foi efetuada em duas etapas: análise univariada e análise multivariada. Na análise univariada, as variáveis que apresentaram um valor de  $p \leq 0,2$  pelo teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando indicado, foram selecionadas para análise multivariada, utilizando-se a regressão logística múltipla (HOSMER; LEMESHOW, 2000). O nível de significância adotado na análise múltipla foi de 5%. Todas as análises foram realizadas com o programa BioStat disponível em: <[http://www.biostats.com.au/DAG\\_Stat/index.html](http://www.biostats.com.au/DAG_Stat/index.html)>

### 3.4 Questionário Epidemiológico

No momento da coleta os proprietários dos cães responderam a um questionário epidemiológico que foi elaborado com o objetivo de verificar a ausência ou presença de algumas práticas e condições que pudessem atuar como possíveis fatores de risco para a ocorrência da erliquiose canina (Anexo).

### 3.5 Obtenção das Amostras

Fizeram parte do experimento 100 cães de diferentes faixas etárias, machos e fêmeas, com ou sem carrapatos, provenientes de diferentes bairros da cidade, coletados aleatoriamente. A colheita do material biológico foi realizada por venopunção cefálica, em um total de 5 ml de sangue, com o auxílio de seringa de 5 ml BD e agulhas 25 X 8 mm BD. O sangue coletado foi depositado imediatamente em tubo de ensaio plástico contendo o anticoagulante citrato de sódio (4%).

Após a coleta, o material foi encaminhado para o Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido, da UFCG, campus de Patos – PB. A amostra foi mantida sobre refrigeração *overnight* para separação de alíquota do plasma para realização da Reação de

Imunofluorescência Indireta (RIFI), e do sangue total para extração de DNA e realização de PCR e qPCR. As amostras foram identificadas individualmente e congeladas a -20°C, até a realização dos exames.

### **3.6 Extração de DNA**

A extração de DNA das amostras de sangue foi realizada por meio de reagente comercial, a base de fenol e tiocianato de guanidina (Brazol<sup>®</sup> – LGC Biotecnologia). Foi adicionado 1ml do reagente para cada 300 µL de amostra. Os tubos foram agitados com auxílio de agitador tipo vortex e 250 µL de clorofórmio gelado foram adicionados. As amostras foram centrifugadas em 12.000g (aproximadamente 10.000 rpm) à 4°C, por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para novos tubos contendo 500 µL de etanol absoluto gelado. Os tubos foram homogeneizados por inversão. As amostras foram centrifugadas por 20 min. O pellet foi lavado 2X com 1 ml de etanol 70%. O pellet foi secado a temperatura ambiente. Para a realização da dosagem de DNA, o pellet foi dissolvido em água ultrapura ou tampão TE 1X estéril (50 µl) e quantificado através de leitura em espectrofotômetro UV/visible de mono haz 230 - 650 nm – Biophotometer plus (Eppendorf<sup>®</sup>).

### **3.7 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)**

A sorologia foi efetuada por meio da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), de acordo com Ristic et al. (1972).

Monocamadas de células DH82, inoculadas com a cepa Jaboticabal de *E. canis*, apresentando 80-90% de infecção, foram desprendidas da garrafa com auxílio de raspadores apropriados. A suspensão de células foi centrifugada a 4000g por 5 minutos. Desprezado o sobrenadante, as células foram ressuspensas na concentração de 10.000 células por mililitro em solução tampão fosfato (PBS pH 7,2 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.4 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.8 mM, NaCl 0,147M). Foram adicionados 10µl da solução em cada orifício das lâminas para imunofluorescência, sendo as mesmas secadas em temperatura ambiente por duas horas, com posterior fixação em acetona por 10 minutos e estocagem a -20°C até o momento do uso.

O ponto de corte estipulado para a RIFI foi a diluição de 1:40, conforme adotado por McBride et al. (2001). Os soros foram aplicados às lâminas com antígeno previamente fixado, sendo incubados por 30 minutos a 37° C em câmara úmida. Em seguida, foram realizadas duas lavagens, com duração de 10 minutos cada, em PBS 7,2. Após a secagem em temperatura ambiente, foi adicionado conjugado de coelho anti-IgG de cão (Sigma-Aldrich®) na diluição de 1:32. Novamente as lâminas foram incubadas a 37° C por 30 minutos e lavadas conforme descrito acima. Após a secagem, aplicou-se glicerina pH 8,5 em cada lâmina e estas foram examinadas em microscópio de epifluorescência BX41 (OLIMPUS®).

Os soros controles positivo e negativo foram cedidos pelo Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), na pessoa do professor Daniel Moura Aguiar.

### **3.8 Reação em Cadeia pela Polimerase convencional (PCRc)**

As amostras de DNA foram testadas por PCR convencional para a presença de *E. canis* com primers que amplificam a região do gene 16S rRNA, conforme protocolo descrito por Sambrook (2003). A sequência dos primers utilizados são EC 01 (5'-GTGGCAGACGGGTGAGTAAT-3') e EC 02 (5'-CGTTGTTTCGGAATTATTGGG-3').

Para a primeira etapa a reação foi composta por 1,0µl do DNA da amostra em 5,0 µl de tampão da PCR (PCR buffer 10X – 100mM Tris-HCl, pH 9,0, 500mM KCl), 0,2mM de cada desoxinucleotídeo (dTTP,dATP, dGTP, dCTP), 1,5mM de Cloreto de Magnésio (MgCl<sub>2</sub>), 0,5 µM de cada primer, previamente sintetizado, 1U de Taq DNA polimerase (Bio Labs®) recombinante e água ultra-pura q.s.p 20 µl. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador. A amplificação consistiu em um ciclo inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, 56,4° C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, e uma extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Após a termociclagem, 5µL de cada reação foi adicionada a 1 µL de Blue green Loading dye I (LGC®) e em sequência aplicados em gel de agarose a 1,2 % e submetidos à eletroforese em cuba horizontal e tampão TBE 0,5 X (Tris base 1M, ácido bórico anidro 1M e EDTA sódico di-hidratado 20 mM). As bandas amplificadas foram visualizadas em transluminador ECX 20.M (Vilber Lourmat®).

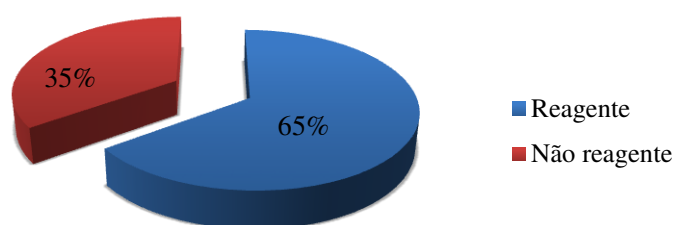
### 3.9 Reação em Cadeia pela Polimerase em tempo real (qPCR)

A amplificação em tempo real foi composta de duas etapas. Para a primeira reação os seguintes reagentes foram utilizados: 6  $\mu\text{L}$  de SYBER Green Rox Plus (LGC<sup>®</sup>), 0,5  $\mu\text{L}$  de cada primer específicos para um gene de múltiplas cópias (informação confidencial para pedido de patente) de *E. canis*, na concentração de 2  $\mu\text{M}$ , 1 $\mu\text{L}$  de DNA de cada amostra e 5 $\mu\text{L}$  de água ultrapura. A termociclagem consistiu em um ciclo inicial a 95° C, durante 15 segundos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, 62° C por 15 segundos e extensão a 72 °C por 15 segundos e uma extensão final a 65 °C por 20 minutos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou a prevalência da infecção por *Ehrlichia canis* em cães domiciliados da cidade de Patos, PB.

Entre as 100 animais testados pela RIFI, 65% possuíam anticorpos anti-*E. canis*, demonstrando a alta prevalência da doença no município (Figura 1). Resultado semelhante foi obtido por Azevedo et al. (2011) em um levantamento em cães atendidos no Hospital Veterinário do Campus da UFCG.



**Figura 1- Prevalência de anticorpos anti - Ehrlichia canis em cães no município de Patos, PB – 2011.**

A erliquiose canina possui ampla distribuição mundial com prevalência elevada principalmente em regiões de clima quente (COHN, 2003). O clima quente predominante na cidade de Patos é um fator que contribui bastante para a disseminação do carrapato (AZEVEDO et al., 2011).

Em Belo Horizonte/MG, Moreira et al. (2003) encontraram 59.6% de positividade e em Jaboticabal/SP, Nakaghi et al. (2008) obtiveram uma taxa de 63.3%. Na Bahia foram

observadas prevalências de 36% e 35,6% na microrregião de Ilhéus-Itabuna e Salvador, respectivamente (CARLOS et al., 2007; SOUZA et al., 2010). Resultados inferiores foram relatados no Paraná (23%) (TRAPP et al., 2006), em Rondônia (31,2%) (Aguiar, 2006), e em Cuiabá (42,5%) (SILVA et al., 2010), em Campos dos Goytacazes (13,9%) (ALBERNAZ et al., 2007). A diferença de prevalências da infecção também pode estar relacionada às diferenças na população de cães estudada, nas diferenças geográficas, na exposição ao vetor e no método diagnóstico utilizado (SOLANO-GALLEGO et al., 2006; RODRIGUEZ-VIVAS et al., 2005).

A sorologia é uma ferramenta bastante utilizada para investigação epidemiológica de diversas enfermidades, mas sua inabilidade para distinguir entre infecção atual e exposição prévia é amplamente reconhecida como uma desvantagem deste teste (MURPHY et al., 1998). A RIFI indica apenas que houve ou há a infecção no animal, não sendo capaz de identificar a espécie envolvida, decorrente da presença de reações cruzadas entre as espécies de *Ehrlichia spp.* (WANER et al., 2001). Os testes sorológicos (dot-ELISA e RIFI) são os métodos mais comumente utilizados para diagnóstico veterinário. Entretanto, o fato do animal ser soropositivo também não significa que ele esteja doente, mas com a realização de testes moleculares, como a PCR, pode-se chegar a um diagnóstico conclusivo (CARLOS et al., 2011).

Foram considerados positivos todos os animais que emitiram fluorescência a partir da diluição 1:40. Os 13 animais que apresentavam títulos maiores ou iguais a 2.560 são altamente sugestivos de infecção atual ou persistente, se o animal não tiver sido tratado. Cães com infecção crônica frequentemente tem altos títulos de anticorpos que persistem após o tratamento. Em um estudo prévio 5 de 61 cães com erliquiose tinham títulos mais baixos que 1:40 (FRANK; BREITSCHWERDT, 1999).

Altos títulos de anticorpos podem estar relacionados a cronicidade da doença e tipo de resposta aberrante ao antígeno (WANER et al., 2001) e são originados pelo estímulo antigênico prolongado causado pela infecção persistente, resultando na produção de imunoglobulinas pelos plasmócitos (PERRILE; MATUS, 1991).

A persistência de altos títulos de anticorpos para *E. canis* pode indicar infecção não debelada, reinfeção ou simplesmente pode ser indicativa de infecção passada (FRANK; BREITSCHWERDT, 1999; WANER et al., 2001), mas seria necessária a realização de testes sorológicos pareados para indicar a soroconversão ou a remissão dos títulos (HARRUS et al., 2002; NEER et al., 2002).

Pela técnica de PCR convencional, houve amplificação do gene 16S rRNA de *E. canis* em 84% dos cães (Figura 2).

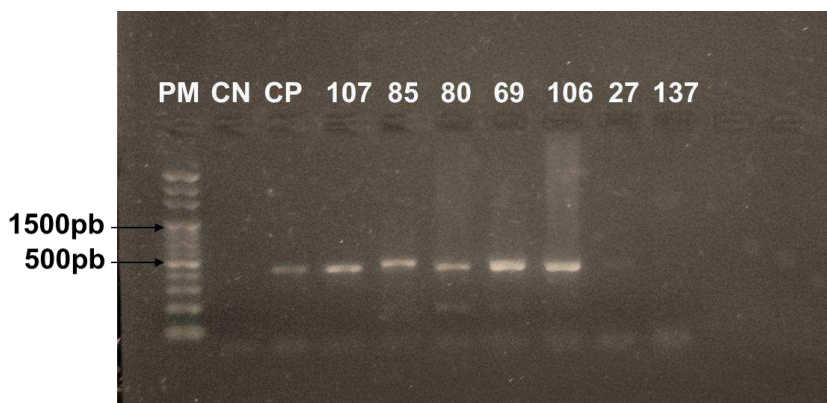


Figura 2: Produtos da reação em cadeia pela polimerase (PCR) com primers específicos para *Ehrlichia canis*.

PM: Peso Molecular; CN: Controle Negativo; CP: Controle Positivo; Setas pretas: amostras positivas; Amostras 27 e 137: amostras negativas.

Resultado semelhante (63.1%) foi observado por Mylonakis et al. (2010). Outros trabalhos evidenciando a alta taxa de positividade pela PCR foram demonstrados por foi observado por: Rodrigues-vivaz et al., (2005) com 44.1% e Ueno et al. (2009) com 40%. Resultados inferiores foram obtidos por Bulla et al. (2004) com 30.9% e Macieira (2005) com 32.1%, Santos et al., (2009) com 25.4% e Alexandre et al. (2009) com 22%. Estas variações podem ser atribuídas aos protocolos utilizados e aos fatores ambientais envolvidos na epidemiologia da erliquiose nas regiões estudadas (SOUZA, et al., 2010).

O teste de PCR pode ser uma alternativa mais sensível aos testes de diagnósticos já existentes, além de ser de mais rápida execução e seguro, permitindo a detecção específica do agente infeccioso, entretanto não distingue portadores soropositivos crônicos de *E. canis* de cães soropositivos não infectados (MCBRIDE et al., 1996).

A técnica de qPCR detectou DNA erliquial em 95% das amostras analisadas. Em estudo desenvolvido por NDIP (2005), 16% (17/104) dos cães apresentaram DNA erliquial na real time PCR, sendo 15 deles DNA de *E. canis*. Outros estudos também têm relatado PCR positiva para cães nos quais não foram detectados anticorpos no soro (MURPHY et al., 1998; LIDDELL et al., 2003). A PCR poderá ser negativa em casos de infecções



passadas ou quando os níveis de DNA erliquial estiverem abaixo dos limites detectáveis por esta técnica.

Apenas 1 amostra foi positiva na RIFI e negativa nas técnicas PCR e qPCR, sugerindo a ocorrência de reação cruzada ou de uma fase crônica da infecção (Tabela 2). Das 100 amostras avaliadas, apenas 1 delas foi negativa nos três testes, sendo este considerado o único animal verdadeiramente negativo. A diferença na concentração dos microrganismos nas amostras de soro e o uso de diferentes métodos de extração de DNA também podem gerar resultados discrepantes (MYLONAKIS et al., 2010).

Tabela 2: Associação das técnicas de RIFI, PCR e da qPCR a partir das 100 amostras de sangue canino.

TÉCNICAS		PCR convencional		PCR em tempo real	
		Negativos	Positivos	Negativos	Positivos
RIFI	Negativos	4	31	1	34
	Positivos	12	53	4	61
	<b>Total</b>	16	84	5	95

RIFI: reação de imunofluorescência indireta; PCRc: PCR convencional; qPCR: real time PCR quantitativo.

Cerca de 30% dos cães negativos na sorologia foram positivos nas técnicas moleculares. Através da associação entre a RIFI, PCR e a qPCR foi possível identificar uma alta porcentagem de animais infectados com *E. canis*, onde vários ainda eram soronegativos. 51% (51/100) das amostras foram positivas nos três testes, indicando uma alta taxa de infecção na área estudada. IQBAL et al. (1994) e WEN et al. (1997) relataram previamente que a PCR possuía sensibilidade e especificidade superior à sorologia. Alguns autores têm sugerido a utilização da combinação da RIFI e PCR no diagnóstico da erliquiose canina, indicando que estes testes são mais sensíveis para detectar a infecção em diferentes estágios.

A diferença no número de cães soropositivos e no número de cães positivos pela PCR tem uma possível explicação: animais infectados geralmente não apresentam sinais clínicos da doença, ou ainda, alguns dos animais positivos podem ter evoluído para cura

enquanto ainda continham quantidades detectáveis de anticorpos anti-*E-canis* (HARRUS et al., 1998a).

Dos 35 animais negativos na RIFI, 34 (97,1%) deles foram positivos na qPCR, indicando possivelmente um animal em fase aguda. Animais infectados mais recentemente podem não ter soro-convertido e, portanto, serem negativos na RIFI (WANER et al., 2001; NEER et al., 2002). Casos hiperagudos podem ser positivos na PCR sem resposta de anticorpos, para os quais testes moleculares detectam a presença do agente antes mesmo da resposta imunológica ocorrer (CARLOS et al., 2011).

Entre os 84% dos animais positivos na PCR convencional para *E. spp.*, 96,4% (81/84) foram também positivos na PCR em tempo real para *E. canis*. Os resultados podem ser observados na tabela 3. Associando-se as duas técnicas foi possível verificar que 99% das amostras são positivas. Alguns dos cães estudados possivelmente sofreram uma EMC clínica, recuperaram-se da doença e apresentaram anticorpos para *E. canis* durante o teste, enquanto outros são prováveis portadores de doença subclínica (WANER et al., 1997; HARRUS et al., 1998b). Por outro lado, algumas amostras positivas podem ser reação cruzada com outra espécie de *Ehrlichia*. Existem descrições de co-infecções por patógenos transmitidos por carrapatos de cães da China (HUA et al., 2000), no Caribe (YABSLEY et al., 2008), Venezuela (SUksAWAT et al., 2001), e Brazil (SANTOS et al., 2009). A alta prevalência de *A. platys* combinada com *E. canis* é devido ao fato de que o *R. sanguineus* é vetor de ambas espécies. A *A. platys* é comumente encontrada na mesma área geográfica que *E. canis* (YABSLEY et al., 2008).

Na fase aguda, a *Ehrlichia* pode ser facilmente detectada no sangue, enquanto que na fase subclínica e crônica, os tecidos mais apropriados para confirmar o diagnóstico são o baço e a medula óssea, respectivamente (HARRUS et al., 1998a,b; MYLONAKIS et al., 2004). Segundo Rotondano et al. (2012), o sangue total foi a melhor fonte de DNA para detectar *Ehrlichia* e *Anaplasma* do que frações sanguíneas de mononucleares, granulócitos e coágulo sanguíneo.

Tabela 3: Resultados obtidos a partir da amplificação do gene 16S rRNA por PCR convencional e PCR em tempo real, sendo a primeira considerada a técnica padrão-ouro.

TÉCNICAS	PCR em tempo real			
		Negativos	Positivos	Total
PCR convencional	Negativos	2	14	16
	Positivos	3	81	84
<b>Total</b>		5	95	100

3,57% (3/84) dos animais positivos na PCR convencional (gênero-específica), foram negativos na PCR em tempo real para *E. canis*. Uma das possibilidades para este resultado negativo é a infecção por outra espécie do gênero *Ehrlichia* ou *Anaplasma*.

Co-infecção com *Ehrlichia* e *Anaplasma* é citada por Huang et al. (2005), Unver et al. (2001), Arraga-Alvarado et al. (2003), Suksawat et al. (2001), Buller et al. (1999) e Hua et al. (2000).

Dos 95 animais positivos na PCR em tempo real, 14,73% (14/95) foram negativos na PCR convencional, sugerindo que as amostras continham baixa concentração de DNA erliquial; A PCR em tempo real é mais sensível que a técnica convencional, capaz de detectar baixas quantidades de DNA. Em Rondônia e São Paulo, Labruna et al. (2007) testaram amostras de carrapatos, capivaras e sangue de cães e humanos com histórico de picada de carrapatos. Em 60% (3/5) dos cães testados havia DNA erliquial e a PCR em tempo real foi capaz de identificar o mínimo de 10 cópias do gene *dsb* de *E. canis*. A sensibilidade mais baixa da PCR pode ser justificada por dois fatores: a) o gene alvo utilizado 16S rRNA possui cópia única e o gene utilizado para a PCR em tempo real tem múltiplas cópias; b) características intrínsecas da qPCR, como o uso de fluorocromos, aumentam a sensibilidade da técnica.

Quando as técnicas foram comparadas para avaliar sensibilidade e especificidade, o índice Kappa apresentou grau de concordância fraco (tabela 4). No caso das técnicas moleculares, isso pode ser justificado pela capacidade da qPCR em detectar baixas quantidades de DNA e do gene utilizado como alvo ter uma maior número de cópias quando comparado ao da PCRc. Em relação à sorologia, deve-se provavelmente à reações cruzadas ou co-infecções.

Tabela 4: Associação estatística entre as técnicas RIFI, PCR e real time PCR no diagnóstico da erliquiose monocítica canina.

	Sensibilidade	Especificidade	Valor Kappa
<b>RIFI x PCRc</b>	81,54%	11,43%	-0,08
<b>RIFI x qPCR</b>	93,85%	2,86%	-0,04
<b>PCRc x qPCR</b>	96,43%	12,5%	0,12

Na análise univariada dos fatores de risco para a infecção por *E. canis* foram selecionadas as variáveis: idade do animal, raça, alimentação, contato com silvestres, contato com galinhas, ambiente de criação, vacinações e vermifugação (tabela 5). Após a análise multivariada as variáveis identificadas como fatores de risco foram a idade do animal (*odds ratio* = 1,6869/ IC 95% = 1,15 - 2,48/ p = 0,1272) e o ambiente de criação (*odds ratio* = 2,2596/ IC 95% = 1,02 - 4,99/ p = 0,0391) (tabela 6). Dos 65 animais positivos para a sorologia, 56 deles apresentavam histórico de carrapatos. Segundo Trapp et al. (2006), o parasitismo por *R. sanguineus* tem sido apontado como principal fator de risco para a erliquiose monocítica canina.

Tabela 5- Análise univariada de fatores de risco associados com a soropositividade para *Ehrlichia canis* em 100 cães do município de Patos, Paraíba.

Variável	Categoria	Total de animais	Soropositivos (%)	Valor de p
Grau de escolaridade do proprietário	Analfabeto	13	10 (76,9%)	0,4071
	1º grau incompleto	24	16 (66,6%)	
	1º grau completo	23	14 (60,8%)	
	2º grau incompleto	15	7 (46,6%)	
	2º grau completo	18	13 (72,2%)	
	3º grau incompleto	1	0 (0,0%)	
	3º grau completo	6	3 (50%)	
Renda familiar do proprietário	Menos de 2 salários mínimos	63	43 (68,3%)	0,4973
	2 a 4 salários mínimos	30	19 (63,3%)	
	4 a 6 salários mínimos	4	2 (50%)	
	6 a 8 salários mínimos	3	1 (33,3%)	
	Mais de 8 salários mínimos			

Variável	Categoria	Total de animais	Soropositivos (%)	Valor de p
Sexo do animal	Macho	52	35 (67,3%)	0,6706
	Fêmea	48	30 (62,5%)	
Idade do animal*	6 – 12 meses	19	12 (63,2%)	0,1272
	12 – 24 meses	24	13 (54,2%)	
	24 – 48 meses	18	11 (61,1%)	
	4 – 6 anos	23	17 (73,9%)	
	Acima de 6 anos	16	12 (75%)	
Raça do animal*	Sem raça definida	70	48 (68,6%)	0,2527
	Com raça definida	30	17 (56,7%)	
Tipo de Criação	Domiciliar	80	52 (65%)	0,7921
	Semi-domiciliar	9	7 (77,8%)	
	Solto	11	6 (54,5%)	
Alimentação*	Ração comercial	15	8 (53,3%)	0,1401
	Alimento preparado em casa	59	43 (72,9%)	
	Ambos	26	14 (53,8%)	
Contato com animais	Sim	72	49 (68,1%)	0,5094
	Não	28	16 (57,1%)	
Contato Equídeos	Sim	1	0 (0,0%)	0,35
	Não	99	65 (65,7%)	
Contato com Silvestres*	Sim	6	6 (100,0%)	0,0884
	Não	94	59 (62,8%)	
Contato com Felinos	Sim	42	25 (59,5%)	0,4628
	Não	58	40 (68,9%)	
Contato com Caninos	Sim	51	32 (62,7%)	0,7371
	Não	49	33 (67,3%)	
Contato com Suínos	Sim	2	2 (100,0%)	0,5404
	Não	98	63 (64,3%)	
Contato com Galinhas*	Sim	8	6 (75%)	0,2549
	Não	92	59 (64,1%)	
Ambiente de criação*	Terra	32	23 (71,9%)	0,0391
	Cimento	48	26 (54,2%)	
	Ambos	20	16 (80%)	

Variável	Categoria	Total de animais	Soropositivos (%)	Valor de p
Limpeza do ambiente	Sim	85	55 (64,7%)	0,7651
	Não	15	10 (66,7%)	
Frequência de Limpeza do Ambiente	Diária	15	10 (66,7%)	0,5246
	Semanal	70	44 (62,9%)	
	Quinzenal	14	10 (71,4%)	
	Mensal	1	1 (100,0%)	
Vacinação	Sim	79	50 (63,3%)	0,6098
	Não	21	15 (71,4%)	
Quais Vacinas*	Anti-rábica	22	15 (68,2%)	0,2732
	Contra viroses	68	46 (67,6%)	
	Ambas	10	4 (40%)	
Vermifugação*	Sim	47	27 (57,4%)	0,1480
	Não	53	38 (71,7%)	
Histórico de carrapatos	Sim	87	55 (63,2%)	0,5342
	Não	13	10 (76,9%)	

\*Variáveis selecionadas para análise multivariada.

Tabela 6- Resultado da análise de regressão logística múltipla para os fatores de risco associados com a soropositividade para *Ehrlichia canis* em 100 cães do município de Patos, Paraíba.

Variável	P valor	Odds ratio	IC 95%
Idade do animal (1 a 2 anos)	0,0079	1,6869	1,15-2,48
Ambiente de criação (cimento)	0,0437	2,2596	1,02-4,99

Animais que apresentavam idade entre 12 e 24 meses foram os de maior positividade. Este resultado é semelhante ao estudo realizado por Faienstein et al. (2008), que verificou que a maior prevalência da erliquiose canina no município de Aracajú, Sergipe, era em cães jovens (36,2% tinham entre 0 e 1 ano). Em trabalho realizado por Ueno et al. (2009) os resultados revelaram maior frequência (65%) de animais positivos com idade até 12 meses. Segundo o autor, estes valores indicam maior risco dos animais, nessa faixa etária, de contraírem a infecção e apresentarem o agente circulante, decorrentes de uma alta contaminação ambiental por carrapatos, que ocasiona exposição ao agente

ainda nos primeiros meses de vida. Esses cães jovens possivelmente se apresentavam na fase aguda da doença. Por outro lado, os cães acima de 12 meses que foram positivos na PCR possivelmente correspondiam, em sua maioria, à reativação da infecção na fase crônica. Resultado diferente foi observado por Azevedo et al. (2011) que perceberam maior frequência de anticorpos anti-*E. canis* conforme o aumento da idade dos cães, embora não tenha havido diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre as faixas etárias. Segundo os autores, animais mais velhos apresentam maiores chances de entrar em contato com o agente em função da idade, somado ao fato de animais mais jovens estarem sob maior cuidado pelos seus proprietários, diminuindo a exposição ao vetor. Uma maior prevalência em cães mais velhos também foi obtida por Conde et al. (2007) em estudo conduzido em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Paulista (UNIP), em Campinas-SP e por Baneth et al. (1996) que relataram, em Israel, maior prevalência de erliquiose em cães adultos e idosos, associando a um maior tempo de exposição ao vetor e maior susceptibilidade para os cães idosos.

O outro fator de risco apontado pela análise foi a manutenção dos animais em ambientes fechados e/ou de cimento. No ciclo de vida dos carrapatos, os ovos são depositados em locais escondidos, como rachaduras e fissuras nas paredes, entre rochas e, às vezes, quase dentro do chão. Eles também podem ser encontrados andando sobre paredes externas das casas, no terreno (entre as pedras) e dentro de fendas e rachaduras. (BARROS-BATTESTI et al., 2006). Uma vez ingurgitadas, as fêmeas se desprendem do hospedeiro para o ambiente, onde procuram locais escondidos, com temperaturas mais frescas e umidade elevada. Portanto, além de vetores, os carrapatos são verdadeiros reservatórios da riquetsia na natureza, uma vez que todas as fases evolutivas, no ambiente, são capazes de permanecer infectadas meses ou anos à espera do hospedeiro, garantindo um foco endêmico prolongado. Como regra geral, pode-se dizer que quanto maior a densidade populacional de hospedeiros, maior será a população de carrapatos. Por esta razão, nos ambientes silvestres, com o mínimo de intervenção humana, as populações de carrapatos tendem a ser mais baixas, já que a densidade de hospedeiros (entendida aqui como oferta de alimento para os carrapatos) vai ser significativamente menor (SÃO PAULO, 2004).

## 5 CONCLUSÕES

A *Ehrlichia canis* apresenta uma alta prevalência no município de Patos-PB e, quando comparadas à sorologia, a PCR e a qPCR foram eficientes na identificação de casos agudos e crônicos. Os proprietários devem ter uma maior atenção em animais mantidos em ambiente de cimento e com faixa etária entre 1 e 2 anos, pois estes fatores aumentam a possibilidade dos cães serem acometidos pela doença.



## 6 REFERÊNCIAS

AGUIAR, D. M. **Aspectos epidemiológicos da erliquiose canina no Brasil**. São Paulo: USP, 2006. 95p. Tese (Doutorado) - Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2006.

AGUIAR, D. M.; SAITO, T. B.; HAGIWARA, M. K.; MACHADO, R. Z., LABRUNA, M.B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural**, v. 37, p. 796-802, 2007.

AGUIAR, D. M.; HAGIWARA, M.; LABRUNA, M. In vitro isolation and molecular characterization of na *Ehrlichia canis* strain from São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 489-493, 2008.

AGUIAR, D. M.; ORLANDELLI, R. Reatividade cruzada entre diferentes isolados brasileiros de *Ehrlichia canis*. In: III Congresso Nacional de Saúde Pública Veterinária e I Encontro Internacional de Saúde Pública Veterinária, 2009, Bonito. Anais do III Congresso Nacional de Saúde Pública Veterinária e I Encontro Internacional de Saúde Pública Veterinária, 2009, 1 CD.

ALBERNAZ, A. P.; MIRANDA, F. J. B.; MELO JR., O. A.; MACHADO, J. A.; FAJARDO, H. V. Erliquiose canina em Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 4, p. 799-806, 2007.

ALEXANDRE, N.; SANTOS, A. S.; NÚNCIO, M. S.; SOUSA, R.; BOINAS, F.; BACELLAR, F. Detection of Ehrlichia canis by polymerase chain reaction in dogs from Portugal. **Veterinary Journal**, v. 181, p. 343-344, 2009.

ALMEIDA, M. F. Resposta imune humoral de cães a vacina inativada, de cérebro de camundongos lactentes, utilizadas nas campanhas anti-rabicas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, n. 5, p. 502-507, 1997.

ALMOSNY, N.R.P.; ALMEIDA, L.E; MOREIRA, N.M.; MASSARD, C.L. Erliquiose clínica em gato (*Felis catus*). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 5, n. 2, p. 82-83, 1998.

ALMOSNY, N. R. P. **Hemoparasitoses em Pequenos Animais Domésticos e como Zoonoses**. 135 p. Rio de janeiro: L. F. Livros, 2002.

ALVES, L. M.; LINHARES, G. F. C.; CHAVES, N. S. T.; MONTEIRO, L. C.; LINHARES, D. C. L. Avaliação de iniciadores e protocolo para o diagnóstico da pancitopenia tropical canina por PCR. **Ciência Animal Brasileira**. Goiânia, v. 6, n. 1, p. 49-54, 2005.

ALVES, R. N. **Isolamento, propagação, caracterização genética e mecanismo de evasão de Ehrlichia canis in vitro**. Uberlândia: UFU, 2010. 83p. Dissertação (Mestrado) -

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

ANDEREG, P. I.; PASSOS, L. M. F., Erliquiose canina - revisão. **Clínica Veterinária**, v.4, n. 18, p. 31-38, 1999.

ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; MACHADO, R. Z.; ALLEGRETTI, S. M.; FELIPPE, P. A. N.; SILVA, K. F.; NAKAGHI, A. C. H. Molecular and serologic detection of *Ehrlichia spp.* in endangered Brazilian wild captive felids. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, n. 3, p. 1017-1023, 2010.

ANGERAMI, R.N.; RESENDE, M.R.; FELTRIN, A.F.C.; KATZ, G.; NASCIMENTO, E.M.; STUCCHI, .RS.B.; SILVA, L.J. Brazilian Spotted Fever: A Case Series from an Endemic Area in Southeastern Brazil - Clinical Aspects. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 252-254, 2006.

APPERSON, C. S.; ENGBER, B.; NICHOLSON, W. L.; MEAD, D. G.; ENGEL, J.; YABSLEY, M. J.; DAIL, K.; JOHNSON, J.; WATSON, D. W. Tick-borne diseases in North Carolina: is "Rickettsia amblyommii" a possible cause of rickettsiosis reported as Rocky Mountain spotted fever? **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 8, n. 5, p. 597-606, 2008.

ARRAGA-ALVARADO, C.; PALMAR, M.; PARRA, O.; SALAS, P. Ehrlichia platys (Anaplasma platys) in dogs from Maracaibo, Venezuela: an ultrastructural study of experimental and natural infections. **Veterinary Pathology**, v. 40, p. 149-156, 2003.

AZEVEDO, S. S.; AGUIAR, D. M.; AQUINO, S. F.; ORLANDELLI, R. C.; FERNANDES, A. R. F.; UCHÔA, I. C. P. Soroprevalência e fatores de risco associados à soropositividade para Ehrlichia canis em cães do semiárido da Paraíba. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science**, v. 48, n. 1, p. 14-18, 2011.

BAKER, J. A.; ROBSON, D. S.; GILLESPIE, J. H.; BURGHER, J. A.; DOUGHTY, M. F. A nomograph that predicts the age to vaccinate puppies against distemper, The Cornell Veterinarian, v. 49, p. 158-167, 1959.

BAKKEN, J. S.; DUMLER, J. S. Clinical Diagnosis and Treatment of Human Granulocytotropic Anaplasmosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 236-247, out, 2006.

BANETH, G.; HARRUS, S.; OHNONA, F. S.; SCHLESINGER, Y. Longitudinal quantification of *Ehrlichia canis* in experimental infection with comparison to natural infection. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 3-4, p. 321-325, 2009.

BANETH, G.; WANER, T.; KOPLAH, A.; WEINSTEIN, S.; KEYSARY, A. Survey of Ehrlichia canis antibodies among dogs in Israel. **Veterinary Record**, v.138 p. 257-259, 1996.

BARROS-BATTESTI, D.M.; ONOFRIO, V. C.; LABRUNA, M. B.; MARTINS, J. R.; GUGLIELMONE, A. A. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região**

**neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies.** São Paulo: Vox/ICTTD/Butantan, 2006. 223p.

BARTSCH, R. C.; GREENE, R. T. Post-therapy antibody titers in dogs with ehrlichiosis: follow-up study on 68 patients treated primarily with tetracycline and/or doxycycline. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 10, p. 271–274, 1996.

BEAUFILS, J. P.; INOKUMA, H.; MARTIN-GRANEL, J.; JUMELLE, P. H.; BARBAULTJUMELLE, M.; BROUQUI, P. *Anaplasma platys* (*Ehrlichia platys*) infection in a dog in France: description of the case, and characterization of the agent. **Revue Médicine Vétérinaire**, v. 153, n. 2, p. 85-90, 2002.

BELLAH, J.R.; SHULL, R.M.; SELCER, E.V.S. *Ehrlichia canis*-related polyarthritis in a dog. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v. 189, n. 8, p. 922-923, 1986.

BIRCHARD, J. S.; SHERDING, G. R. Clínica de pequenos animais. **Manual Saunders**. 2 ed, São Paulo: Roca, 2003.

BOOL, P. H.; STMOLLER, P. *Ehrlichia canis* infections in dogs on Aruba (Netherlandas Antilles). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.130, p. 418, 1957.

BOWMAN, D. D. **Georgis' parasitology for veterinarians**. 6. ed. Philadelphia: Editora Saunders, 1995. 430 p.

BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; HANCOCK, S. I. Sequential evaluation of dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia ewingii*, or *Bartonella vinsonii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 2645-2651, 1998.

BRITO, C. C. **Erlichiose canina - aspectos clínicos e terapêuticos no Hospital Veterinário/UFCG/Patos-PB**. Patos: UFCG, 2006. Monografia – Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Patos-PB, 2006.

BURGUEN, G. A.; BEISEL, W. R.; WALKER, J. S.; NIMS, R. M.; HUXSOLL, D. L.; HILDEBRANDT, P. K. Development of hiperglobulinemia in tropical canine pancytopenia. **American Journal of Veterinary Research**, v. 32, n. 5, p. 749-756, 1971.

BULLA, C.; TAKAHIRA, R.K.; ARAÚJO Jr, J.P.; TRINCA, L. A.; LOPES, R. S.; WIEDMEYER C. E. The relationship between degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. **Veterinary Research**, p.141-146, 2004.

BULLER, R.S.; ARENS, M.; HMIEL, S. P.; PADDOCK, C. D.; SUMNER, J. W.; RIKIHISA, Y.; UNVER, A.; GAUDREAU-KEENER, M.; MANIAN, F. A.; LIDDELL, A. M.; SCHMULEWITZ, N.; STORCH, G. A. *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 148-155, 1999.

CALIC, S.B.; GALVÃO, M.A.; BACELLAR, F.; ROCHA, C.M.; MAFRA, C.L.; LEITE, R.C.; WALKER, D. H. Human ehrlichiosis in Brazil: first suspect cases. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 8, suppl. 3, p. 259-262, 2004.

CÁRDENAS, A. M.; DOYLE, C. K.; ZHANG, X.; NETHERY, K.; CORSTVET, R. E.; WALKER, D. H.; MCBRIDE, J. W. Enzyme-linked immunosorbent assay with conserved immunoreactive glycoproteins gp36 and gp19 has enhanced sensitivity and provides species-specific immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* infection. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, p. 123–128, 2007.

CARLOS, R. S. A.; NETA, E. S. M.; SPAGNOL, F. H.; OLIVEIRA, L. L. S.; BRITO, R. L. L.; ALBUQUERQUE, G. R.; ALMOSNY, N. R. P. Frequencia de Anticorpos anti-*Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi* e Antígenos de *Dirofilaria immitis* em cães na microregião Ilhéus – Itabuna, Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 3, p. 117-120, 2007.

CARLOS, R. S. A.; CARVALHO, F. S.; WENCESLAU, A. A.; ALMOSNY, N.R.; ALBUQUERQUE, G.R. Risk factors and clinical disorders of canine ehrlichiosis in the South of Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 20, p. 210-214, 2011.

CHIARI, M. F. **Nova metodologia de diagnóstico para *Ehrlichia canis*: PCR x LAMP**. São Carlos: UFSCar, 2010. 71p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

COHN, L. A. Ehrlichiosis and related infections. **The Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 33, p. 863-884, 2003.

CORREA, W. M.; CORREA, C. N. M. Outras rickettsioses: In: **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Medsi, cap. 48, p. 477-83, 1992.

COSTA JR, L. M.; REMBECK, K; RIBEIRO, M. F. B.; BEELITZ, P.; PFISTER, K.; PASSOS, L. M. F. Seroprevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **The Veterinary Journal**, v. 174, p. 673-676, 2007.

COSTA, P.S.; VALLE, L.M.; BRIGATTE, M.E.; GRECO, D.B. More about human monocytotropic ehrlichiosis in Brazil: serological evidence of nine new cases. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, suppl. 1, p. 7-10, feb. 2006.

COSTA, J. O.; BATISTA JÚNIOR, J. A.; SILVA, M.; GUIMARÃES, P. M. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte - Brazil. **Arquivo da Escola de Veterinária, UFMG**, v. 25, n. 2, p. 199-200, 1973.

DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, O. Erliquiose nos animais e no homem. **Semina: Ciências Agrárias**, n. 2. p. 191- 201, 2001.

DAGNONE, A. S. Soroepidemiologia e avaliação citológica e molecular da infecção por *Ehrlichia* sp. em cães de uma população hospitalar. Londrina, 2002. **Dissertação (Mestrado em Sanidade Animal)** – Universidade Estadual de Londrina, 114p. 2002.

DAGNONE, A. S.; MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, M. C.; JOJIMA, F. S.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 285-290, 2003.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L.A.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 64-67, 2006.

DAGNONE, A. S.; SOUZA, A. I.; ANDRÉ, M.R.; MACHADO, R. Z. Molecular diagnosis of Anaplasmataceae organisms in dogs with clinical and microscopical signs of ehrlichiosis. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 4, p. 20-25, 2009.

DAVOUST, B. L. Ehrlichiose canine. **Le point vétérinaires**, v. 25, n. 151, p. 43-51, 1993.

DAWSON, J. E. ANDERSON, B. E.; FISHBEIN, D. B.; SANCHEZ, J. L.; GOLDSMITH, C. S.; WILSON, K. K.; DUNTLEY, C. W. Isolation and Characterization of an *Ehrlichia* sp. From a Patient Diagnosed with Human Ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 2741-2745, dec. 1991.

DO CARMO, E.F.S.; FIORINI, A. Principais técnicas moleculares para detecção do papilomavírus humano. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 2, n. 1, p. 29-31, 2007.

DOYLE, C. K.; LABRUNA, M. B.; BREITSCHWERDT, E. B.; TANG, Y. W.; CORSVET, R.E., HEGARTY, B.C., BLOCH, K.C., LI, P., WALKER, D.H., MCBRIDE, J.W. Detection of medically important *Ehrlichia spp.* by quantitative multicolor Taqman real-time PCR of the dsb gene. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 7, n. 4, oct, 2005.

DUMLER, J. S. BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

EGENVALL, A. E.; HEDHAMMAR, A. A.; BJOERSDORFF, A. I. Clinical features and serologic of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. **Veterinary Record**, v.140, n. 9, p. 222-226, 1997.

EGENVALL, A.; LILLIEHOOK, I.; BJOERSDORFF, A.; ENGVALL, L. E. O.; KARLSTAM, E.; ARTURSSON, K.; HELDTANDER, M.; GUNNARSSON, A. Detection of granulocytic *Ehrlichia* species DNA by PCR in persistently infected dogs. **Veterinary Record**, v. 12, p. 186-190, feb. 2000.

EWING, S. A.; ROBERSON, W. R.; BUCKNER, P. G.; HAYAT, C. S. A new Strain of *Ehrlichia canis*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 159, n. 12, p. 1771-1774, 1971.

FAIERSTEIN, C. C.; SILVA, E. P.; FEBRÔNIO, A. M. B. Notas sobre a Erliquiose canina no município de Aracajú, SE (2006- 2007). **Biologia Geral Experimental**, v. 2, n. 8, p. 5-7, 2008.

FIGUEIREDO, L.T.M.; BADRA, S.J.; PEREIRA, L.E.; SZABÓ, M.P.J. Report on ticks collected in the Southeast and Mid-West regions of Brazil: analyzing the potential transmission of tick-borne pathogens to man. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 32, p. 613-619, 1999.

FILONI, C.; CATÃO-DIAS, J. L.; BAY, G.; DURIGON, E. L.; JORGE, R. S.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. First evidence of feline herpesvirus, calicivirus, parvovirus, and *ehrlichia* exposure in brazilian free-ranging felids. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 42, n. 2, p. 470-477, 2006.

FRANK, J. R.; BREITSCHWERDT, E. B. A retrospective study of ehrlichiosis in 62 dogs from North Carolina and Virginia. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, n. 3, p. 194-201, 1999.

GAL, A.; LOEB, E.; YISASCHAR-MEKUZAS, Y.; BANETH, G. Detection of *Ehrlichia canis* by PCR in different tissues obtained during necropsy from dogs surveyed for naturally occurring canine monocytic ehrlichiosis. **The Veterinary Journal**, v. 175, suppl. 2, p. 212-217, feb. 2008.

GAUNT, S.D; BEALL, M.U; STILLMAN, B.A; LORENTZEN, L.; DINIZ, P.P.V.P.; CHANDRASHEKAR, R.; BREITSCHWERDT, E.B. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. **Parasites & Vectors**, v.3, p. 33, 2010.

GREENE, C.E.; HARVEY, J. W. Canine ehrlichiosis. Clinical, microbiology and infectious diseases of the dog and cat. **Saunders**, p. 545-557, 1984.

HANCOCK, S.I.; BREITSCHWERDT, E.B.; PITULLE, C. Differentiation of *Ehrlichia platys* and *E. equi* infections in dogs by using 16S ribosomal DNA-based PCR. **Journal of clinical Microbiology, Washington**, v. 39, n. 12, p. 4577-4578, 2001.

HARRUS, S., WANER, T., AVIDAR, Y., BOGIN, E., PEH, H., BARK, H. Serum protein alterations in canine ehrlichiosis. **Veterinary Parasitology** 66, 241–249, 1996.

HARRUS, S.; KASS, P. H.; KLEMENT, E.; WANER, T. Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease. **Veterinary Record**, v. 141, n. 14, p. 360-363, 1997.

HARRUS, S., WANER, T.; AIZENBERG, I.; FOLEY, J. E.; POLAND, A. M.; BARK, H. Amplification of ehrlichial DNA from dogs 34 months after infection with *Ehrlichia canis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 73–76, 1998a.

HARRUS, S., WANER, T., AIZENBERG, I.; BARK, H.: Therapeutic effect of doxycycline in experimental subclinical canine monocytic ehrlichiosis: evaluation of a 6-week course. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 2140-2142, 1998b.

HARRUS, S.; WANER, T.; BARK, H.; JONGEJAN, F.; CORNELISSEN, A. W. C. A. Canine Monocytic Ehrlichiosis - Recent Advances. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 2745-2749, 1999.

HARRUS, S.; ALLEMAN, A. R.; BARK, H.; MAHAN, S. M.; WANER, T. Comparison of three enzyme-linked immunosorbant assays with the indirect immunofluorescent antibody test for the diagnosis of canine infection with *Ehrlichia canis*. **Veterinary Microbiology**, v. 86, p. 361-368, 2002.

HARRUS, S.; WANER, T.; Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. **Veterinary Journal**, v. 187, n. 3, p. 292-296, 2011.

HILDEBRANDT, P. K.; CONROY, J. D.; McKEE, A. E.; NYINDO, M. B. A.; HUXSOLL, D. L. Ultrastructure of *Ehrlichia canis*. **Infection and Immunity, Washington**, v. 7, n. 2, p. 265-271, 1973.

HOSMER, D. W.; LEMESHOW, S. **Applied Logistic Regression**. New York: John Wiley & Sons, 2000. 375 p.

HUA, P.; YUHAI, M.; SHIDE, T.; YANG, S.; BOHAI, W.; XIANGRUI, C. Canine ehrlichiosis caused simultaneously by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia platys*. **Microbiology and Immunology**, v. 44, p. 737-739, 2000.

HUANG, H.; UNVER, A.; PEREZ, M. J.; ORELLANA, N. G.; RIKIHISA, Y. Prevalence and molecular analysis of *Anaplasma platys* in dogs in Lara, Venezuela. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v. 36, p. 211-216, 2005.

HUXSOLL, D. L.; HILDEBRANDT, P. K.; NIMS, R. M.; AMYX, H. L.; FERGUSON, J. A. Epizootiology of Tropical Canine Pancytopenia. **Journal of Wildlife Disease**, v. 6, p. 220-225, 1970.

INOKUMA, H.; OYAMADA, M., KELLY, P. J.; JACOBSON, L.A., FOURNIER, P., ITAMOTO, K., OKUDA, M., BROUQUI, P. Molecular detection of a new *Anaplasma* species closely related to *Anaplasma phagocytophilum* in canine blood from south Africa. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 2934-2937, jun. 2005.

INOKUMA, H.; PAROLA P.; RAOULT, D.; BROUQUI, P. Molecular survey of *Ehrlichia* infection in ticks from animals in Yamaguchi prefecture, Japan. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 99, n. 4, p. 335-339, 2001.

IQBAL, Z.; CHAICHANASIRIWITHAYA, W.; RIKIHISA, Y. Comparison of PCR with other test for early diagnosis of canine ehrlichiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 1658-63, 1994.

KAWAHARA, M.; RIKIHISA, Y.; ISOGAI, E.; TAKAHASHI, M.; MISUMI, H.; SUTO, C.; SHIBATA, S.; ZHANG, C.; TSUJI, M. Ultrastructure and phylogenetic analysis of '*Candidatus Neoehrlichia mikurensis*' in the family Anaplasmataceae, isolated from wild

rats and found in *Ixodes ovatus* ticks. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 1837-1843, 2004.

KEEFE, T. J.; HOLLAND, C. J.; SALYER, P. E.; RISTIC, M. Distribution of *Ehrlichia canis* among military working dogs in the world and selected civilian dogs in the United States. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 181, n. 3, p. 236-238, 1982.

KEYSARY, A.; WANER, T.; STRENGER, C.; HARRUS, S. Cultivation of *Ehrlichia canis* in a continuous BALB/C mouse macrophage cell culture line. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 13, n. 6, p. 521-523, 2001.

KLEDMANEE, K.; SUWANPAKDEE, S.; KRAJANGWONG, S.; CHATSIRIWECH, J.; SUKSAI, P.; SUWANNACHAT, P.; SARIYA, L.; BUDDHIRONGAWATR, R.; CHAROONRUT, P.; CHAICHOUN, K. Development of multiplex polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp and *Hepatozoon canis* in canine blood. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, v. 40, p. 35-39, jan. 2009.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapatos em cães do Brasil. **Clínica Veterinária**, v. 30, p. 24-32, 2001.

LABRUNA, M. B.; MCBRIDE, J. W.; CAMARGO, L. M. AM; AGUIAR, D. M.; YABSLEY, M. J.; DAVIDSON, W. R.; STROMDAHL, E. Y.; WILLIAMSON, P. C.; STICH, R. W.; LONG, S. W.; CAMARGO, E. P. WALKER, D. H. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 189-195, 2007.

LIDDELL, A.M.; STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A.; SUMNER, J.W.; PADDOCK, C.D.; GAUDREAU-KEENER, M.; ARENS, M.Q.; STORCH, G.A. Predominance of *Ehrlichia ewingii* in Missouri dogs. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4617-4622, 2003.

LÓPEZ, J. RIVERA, M.; CONCHA, J. C.; GATICA, S.; LOEFFEHOLZ, M.; BARRIGA, O. Serologic evidence for human Ehrlichiosis in Chile. **Revista Médica de Chile**, v. 131, n. 1, p. 67-70, 2003.

MACHADO, R. Z. Erliquiose Canina. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, supl. 1, p. 53-57, 2004.

MACIEIRA, D.B.; MESSICK, J.B.; CERQUEIRA, A.M.; FREIRE, I.M.; LINHARES, G.F.; ALMEIDA, N.K.; ALMOSNY, N.R. Prevalence of *Ehrlichia canis* infection in thrombocytopenic dogs from Rio de Janeiro, Brazil. **Veterinary Clinical Pathology**, v.34, n.1, p. 44-8, 2005.

MANOEL, C. S. **Alterações clínicas, hematológicas e sorológicas de cães infectados por *Ehrlichia canis***. São Paulo: USP, 2010. 65 p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.



MCBRIDE, J. W.; CORSTVET, R. E., GAUNT, S. D.; CHINSANGARAM, J.; AKITA, G. Y.; OSBURN, B. I. PCR detection of acute *Ehrlichia canis* infection in dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 8, p. 441-447, 1996.

MCBRIDE, J.W.; CORSTVET R. E.; BREITSCHWEDT, E. B.; WALKER, D. H. Immunodiagnosis of *Ehrlichia canis* Infection with Recombinant Proteins. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 315-322, jan. 2001.

MCBRIDE, J. W.; CORSTVET, R. E., GAUNT, S. D., BOUDREAUX, C., GUEDRY, WALKER, D. H. Kinetics of antibody response to *Ehrlichia canis* immunoreactive proteins. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 2516-2524, 2003.

MELO, A. L.; MARTINS, T. F.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; PACHECO, R.C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Seroprevalence and risk factors to Ehrlichia spp. and Rickettsia spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 2, p. 213-218, 2011.

MOREIRA, S. M.; BASTOS, C. V.; ARAUJO, R. B. Estudo retrospectivo (1998 a 2001) da erliquiose canina em Belo Horizonte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 2, p. 141-147, abr. 2003.

MURPHY, G. L.; EWING, S. A.; WHITWORTH, L. C.; FOX, J. C.; KOCAN, A. A. A molecular and serologic survey of *Ehrlichia canis*, *E. chaffeensis*, and *E. ewingii* in dogs and ticks from Oklahoma. **Veterinary Parasitology**, v. 79, p. 325-339, 1998.

MUTANI, A.; KAMINJOLO, J. S. The value *in vitro* cell culture of granulocytes in the detection of *Ehrlichia*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 4, p. 377-380, 2001.

MYLONAKIS, M.E.; KOUTINAS, A. F., BREITSCHWERDT, E. B., HEGARTY, B. C., BILLINIS, C. D., LEONTIDES, L. S., KONTOS, V. S. Chronic canine ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): a retrospective study of 19 natural cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 40, p. 174–184, 2004.

MYLONAKIS, M. E.; SIARKOU, V. I.; LEONTIDES, L.; BOURTZIHATZOPOULOU, E.; KONTOS, V.I.; KOUTINAS, A.F. Evaluation of a serum based PCR assay for the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis. **Veterinary Microbiology**, v.138, p. 390–393, 2009.

MYLONAKIS, M. E.; KRITSEPI-KONSTANTINOY, M.; DUMLER, J. S.; DINIZ, P. P.; DAY, M. J.; SIARKOU, V. I.; BREITSCHWERDT, E. B.; PSYCHAS, V.; PETANIDES, T.; KOUTINAS, A. F. Severe hepatitis associated with acute *Ehrlichia canis* infection in a dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 24, p. 633-638, 2010.

NAKAGHI A. C. H.; MACHADO, R.Z.; COSTA, M.T.; ANDRÉ, M.R.; BALDANI, C.D. Erliquiose canina: aspectos clínicos, hematológicos, sorológicos e moleculares, **Ciência Rural**, v. 38, p. 766-770, 2008.

NDIP, L.M.; NDIP, R. N.; ESEMU, S. N.; DICKMU, V.L.; FOKAM, E.B.; WALKER, D.H.; MCBRIDE, J. W. Ehrlichial infection in cameroonian canines by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia ewingii*. **Veterinary Microbiology**, v. 111, p. 59–66, 2005.

NEER, T.M.; EDDLESTONE, S. M.; GAUNT, S. D.; CORSTVET, R. Efficacy of enrofloxacin for the treatment of experimentally induced *Ehrlichia canis* infection. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, p. 501-504, 1999.

NEER, T. M.; BREITSCHWERDT, E. B.; GREENE, R. T.; LAPPIN, M. R. Consensus statement on ehrlichial disease of small animals from the infectious disease study group of the ACVIM. **Journal of Veterinary Internal Medicine, Lawrence**, v. 16, p. 309-315, may-jun, 2002.

NOORDHUIZEN, J. P. T. M.; FRANKENA, K.; VAN DER HOOFD, C. M.; GRAAF, E. A. M. **Application of quantitative methods in veterinary epidemiology**. Wageningen: Wageningen Pers, 1997. 445p.

NOTOMI, T.; OKAYAMA, H.; MASUBUCHI, H.; YONEKAWA, T.; WATANABE, K.; AMINO, N.; HASE, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 12, 2000.

NOVAIS, C.M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, p. 10-13, n. 33, 2004.

NYINDO, M.; HUXSOLL, D. L.; RISTIC, M.; KAKOMA, I.; BROWN, J. L.; CARSON, A.; STEPHENSON, E. Cell-mediated and humoral immune responses of German Shepherd Dogs and Beagles to experimental infection with *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 41, p. 250-254, 1980.

O'CONNOR, T.P. HANSCOM, J.L., HEGARTY, B.C., GROAT, R.G., BREITSCHWERDT, E.B. Comparison of an indirect immunofluorescence assay, western blot analysis, and a commercially available ELISA for detection of *Ehrlichia canis* antibodies in canine sera. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, p. 206-210, 2006.

OLIVEIRA, D.; NISHIMORI, C.T.; COSTA, M.T.; MACHADO, R.Z.; CASTRO, M.B. Anti-*Ehrlichia canis* antibodies detection by Dot-Elisa in naturally infected dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 9, p. 1-5, 2000.

OLIVEIRA, L. S.; MOURÃO, L. C.; OLIVEIRA, K. A.; AGOSTIN, N. M.; DE OLIVEIRA, A. C.; DE ALMEIDA, A. C. M. R.; FIETTO, J. L. R.; CONCEIÇÃO, L. G.; FILHO, J. D. R.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. Molecular detection of *Ehrlichia canis* in cats in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, suppl. 2, p. 53-54, 2009.

OYAFUSO, M. K. DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O.; MORAIS, H. S. A. Caracterização de carrapatos parasitas de cães em uma população hospitalar no norte do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, n. 1, p. 71-74, 2002.

- PADDOCK, C.D.; CHILDS, J.E. Ehrlichia chaffeensis: a prototypical emerging pathogen. **Clinical Microbiology Review**, v. 16, suppl. 1, p. 37-64, 2003.
- PEREZ, M. et al. Human infection with Ehrlichia canis accompanied by clinical signs in Venezuela. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1078, n. 1, p. 110-117, 2006.
- PERRILE, A. L.; MATUS, R. E. Canine ehrlichiosis in six dogs with persistently increased antibody titers. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 5, p. 195-198, 1991.
- RAMOS, C. A. N.; RAMOS, R. A. N.; ARAUJO, F. R.; GUEDES, JR. D. S.; SOUZA, I. I. F.; ONO, T. M.; VIEIRA, A. S.; PIMENTEL, D. S.; ROSAS, E. O.; FAUSTINO, M. A. G.; ALVES, L. C. Comparação de nested-PCR com o diagnóstico direto na detecção de *Ehrlichia canis* em cães. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal**, v18, supl.1, p. 58-62, dez. 2009.
- RIECK, S. E. **Caracterização Molecular, antigênica e epidemiológica da *Ehrlichia canis* em Uberlândia, MG, Brasil**. Minas Gerais: UFU, 2011, 102 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia na Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.
- RIKIHISA, Y. Cross-reacting antigens between *Neorickettsia helminthoeca* and *Ehrlichia* species, shown by immunofluorescence and Western immunoblotting. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 2024-2029, 1991.
- RIKIHISA, Y.; EWING, S. A.; FOX, J. C.; SIREGAR, A. G.; PASARIBU, F. H.; MALOLE, M. B. Analyses of *Ehrlichia canis* and a canine granulocytic *Ehrlichia* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 143-148, 1992.
- RIKIHISA, Y.; EWING, S. A.; FOX, J. C. Western immunoblot analysis of *Ehrlichia chaffeensis*, *E. canis*, or *E. ewingii* infections in dogs and human. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 9, p. 2107-2112, sep. 1994.
- RIPOLL, C. M.; REMONDEGUI, C. E.; ORDONEZ, G.; ARAZAMENDI, R.; FUSARO, H.; HYMAN, M. J.; PADDOCK, C. D.; ZAKI, S. R.; OLSON, J. G.; SANTOS-BUCH, C. A. Evidence of Rickettsial spotted fever and Ehrlichial infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 2, p. 350-354, 1999.
- RISTIC, M.; HUXSOLL, D. L.; WEISIGER, R. M.; HILDEBRANDT, P. K.; NYINDO, M. B. A. Serological diagnosis of tropical canine pancytopenia by indirect immunofluorescence. **Infection and Immunity**, v. 6, n. 3, p. 226-231, sep. 1972.
- RODRIGUES, D.; DAEMON, E.; RODRIGUES, A. F. S. F.; FELICIANO, E. A.; SOARES, A. O.; SOUZA, A. D. Levantamento de hemoparasitos em cães da área rural de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, supl. 1, p. 371, 2004.

RODRIGUES-VIVAZ, R. I.; ALBORNOZ, R. E. F.; BOLIO, G. M. E. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. **Veterinary Parasitology**, v. 4, p. 81-85, 2005.

SÃO PAULO. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN. **Manual de vigilância acarológica** / coordenação Vera Lucia Fonseca de Camargo-Neves. São Paulo: A Secretaria, 2004. 66 p.

SAINZ, A. **Aspectos clínicos y epizootiológicos de la ehrlichiosis canina. Estudio comparado de la eficacia terapéutica de la doxiciclina y el dipropionato de imidocarb.** Madrid: UCM, 1996. 255 p. Tese (Doutorado), Universidad Complutense de Madrid. Madrid, 1996.

SANTOS, F.; COPPEDE, J. S.; PEREIRA, A. L.; OLIVEIRA, L. P.; ROBERTO, P. G.; BENEDETTI, R. B.; ZUCOLOTO, L. B.; LUCAS, F.; SOBREIRA, L.; MARINS, M. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia spp.* in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. **Veterinary Journal**, v. 179, p. 145-148, 2009.

SHAW, S.E.; DAY, M.J.; BIRTLES, R.J.; BREITSCHWERDT, E.B. Tickborne Infectious diseases of dogs. **Trends Parasitology**, v.17, p.74-80, 2001.

SILVA, J. N.; ALMEIDA, A. B. P. F.; SORTE, E. C. B.; FREITAS, A. G.; SANTOS, L. G. F.; AGUIAR, D. M.; SOUSA, V. R. F. Soroprevalência de anticorpos anti- *Ehrlichia canis* em cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 108-111, 2010.

SOLANO-GALLEGO, L.; HEGARTY, B.; ESPADA, Y.; LLULL, J.; BREITSCHWERDT, E. B. Serological and molecular evidence of exposure to arthropod-borne organisms in cats from northeastern Spain. **Veterinary Microbiology**, v. 118, p. 274- 277, 2006.

SOUZA, B. M. P. S.; LEAL, D. C.; BARBOZA, D. C. P. M.; UZÊDA, R. S.; DE ALCÂNTARA, A. C.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B.; GONDIM, L. F. P.; FRANKE, C. R. Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 89-93, 2010.

SPOLIDORIO, M.G.; LABRUNA, M.B.; MANTOVANI, E.; BRANDAO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.J.; YOSHINARI, N.H. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, p. 521-523, 2010.

STADES, F. C. **Fundamentos de Oftalmologia Veterinária**. 1 ed. São Paulo: Editora Manole. 1999.

STEPHENSON, E. H.; OSTERMAN, J. V. Canine peritoneal macrophages: cultivation and infection with *Ehrlichia canis*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 11, p. 1851-1859, 1977.

STICH, R.W.; SCHAEFER, J. J.; BREMER, W. G.; NEEDHAM, G. R.; JITTAPALAPONG, S. Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as

related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, n. 158, p. 256-273, 2008.

SUKSAWAT, J.; PITULLE, C.; ARRAGA-ALVARADO, C.; MADRIGAL, K.; HANCOCK, S.I.; BREITSCHWERDT, E.B. Coinfection with three *Ehrlichia* species in dogs from Thailand and Venezuela with emphasis on consideration of 16S ribosomal DNA secondary structure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 90–93, 2001.

SIMPSON, C. F. Relationship of *Ehrlichia canis* - infected mononuclear cells to blood vessels of lungs. **Infection and Immunity**, v. 10, n. 3, p. 590-596, 1974.

THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. 2. ed. Cambridge: Blackwell Science, 1995, 479 p.

TILLEY, L. P.; SMITH JR., F. W. K. **Consulta veterinária em 5 minutos: espécie canina e felina**. 2 ed. São Paulo: Manole, 2003. 1423 p.

TORRES, H.M.; MASSARD, C. L. FIGUEIREDO, M. J.; FERREIRA, T.; ALMOSNY, R. P. Isolamento e propagação da *Ehrlichia canis* em células DH82 e obtenção de antígeno para a reação de imunofluorescência indireta. **Revista brasileira de ciência veterinária**, v.9, n.2, p.77-82, 2002.

TRAPP, S. M; DAGNONE, A. S.; VIDOTTO, O.; FREIRE, R. L.; MORAIS, H. S. A. Seroepidemiology of canine babesiosis and ehrlichiosis in a hospital population. **Veterinary Parasitology**, v. 140, n. 3-4, p. 223-230, 2006.

UENO, T.E.H; AGUIAR, D.M; PACHECO, R.C; RICHTZENHAIN,L.J; RIBEIRO, M.G; PAES, A.C; MEGID, J.; LABRUNA, M.B. *Ehrlichia canis* em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal, v. 18, n. 3, p. 57-61, 2009.

UNVER, A.; PEREZ, M.; ORELLANA, N.; HUANG, H.; RIKIHISA, Y. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 8, p. 2788-2793, 2001.

USA. ***Ehrlichiosis***. Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ehrlichiosis/index.html>. Acesso em: 29/05/2012.

USPENSKY, I.; IOFFE-USPENSKY, I. The dog factor in brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) infestations in and near human dwellings. **Internacional Journal of Medical Microbiology**, v. 291, Suppl. 33, p. 156-163, 2002.

VIEIRA, R. F. C.; BIONDO, A. B.; GUIMARÃES, A. M. S.; SANTOS, A. P.; SANTOS, R. P.; DUTRA, L. H.; DINIZ, P. P. V. P.; MORAIS, H. A.; MESSICK, J. B.; LABRUNA, M. B.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal**, v. 20, n. 1, p. 1-12, jan-mar. 2011.

WALKER, J. S.; RUNDQUIST, J. D.; TAYLOR, R.; WILSON, B. L.; ANDREWS, M. R.; BARCK, J.; HOGGE, JR. A. L.; HUXSOLL, D. L.; HILDEBRANDT, P. K.; NIMS, R.

M. Clinical and clinicopathologic findings in tropical canine pancytopenia. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 157, p. 43-55, 1970.

WANER, T., HARRUS, S., WEISS, D.J., BARK, H.; KEYSARY, A.: Demonstration of serum antiplatelet antibodies in experimental acute canine ehrlichiosis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 48, p.177-182, 1995

WANER, T., HARRUS, S., BARK, H., BOGIN, E., AVIDAR, Y., KEYSARY, A. Characterization of the subclinical phase of canine ehrlichiosis in experimentally infected beagle dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 69, p. 307-317, 1997.

WANER, T. HARRUS; S. JONGEJAN, F.; BARK, H.; KEYSARY, A.; CORNELISSEN, A. W. Significance of serological testing for ehrlichial diseases in dogs with special emphasis on the diagnosis of canine monocytic ehrlichiosis caused by *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, v. 95, p. 1-15, 2001.

WATANABE, M.; OKUDA, M.; TSUJI, M.; INOKUMA, H. Seroepidemiological study of canine ehrlichial infections in Yamaguchi prefecture and surrounding areas of Japan. **Veterinary Parasitology**, v. 124, p. 101-107, 2004.

WEN, B.; RIKIHISA, Y.; MOTT, J. M.; GREENE, R.; KIM, H. Y.; ZHI, N.; COUTO, G. C.; UNVER, A.; BARTSCH, R. Comparison of nested PCR with immunofluorescent antibody assay for detection of *Ehrlichia canis* infection in dogs treated with doxycycline. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1852-1855, 1997.

WOODY, B.J.; HOSKINS, J.D. Ehrlichial diseases of the dog. **Veterinary Clinical North America: Small animal practice**, v. 21, p. 45-98, 1991.

YABSLEY, M. J.; LOFTIS, A. D.; LITTLE, S. E. Natural and experimental infection of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from the United States with an *Ehrlichia sp.* closely related to *Ehrlichia ruminantium*. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 44, n. 2, p. 381-387, 2008.

# **ANEXO**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**  
**CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL**  
**UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CAMPUS DE PATOS**

**QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO – N° \_\_\_\_\_**

<b>I DADOS DO PROPRIETÁRIO</b>	
1- Nome:	
2- Endereço:	Cidade:
3- Bairro:	CEP:
4- Telefone:	
5- Grau de escolaridade:	<input type="checkbox"/> Analfabeto <input type="checkbox"/> 1º grau incompleto <input type="checkbox"/> 1º grau completo <input type="checkbox"/> 2º grau incompleto <input type="checkbox"/> 2º grau completo <input type="checkbox"/> 3º grau incompleto <input type="checkbox"/> 3º grau completo
6- Renda familiar	<input type="checkbox"/> Menos de 2 salários mínimos <input type="checkbox"/> 2 a 4 salários mínimos <input type="checkbox"/> 5 a 6 salários mínimos <input type="checkbox"/> Mais de 6 salários mínimos
<b>II DADOS DO ANIMAL</b>	
7- Nome:	
8- Sexo:	<input type="checkbox"/> Macho <input type="checkbox"/> Fêmea
9- Idade:	<input type="checkbox"/> 6 – 12 meses <input type="checkbox"/> 12 – 24 meses <input type="checkbox"/> 24 – 48 meses <input type="checkbox"/> 4 – 6 anos <input type="checkbox"/> Acima de 6 anos
10- Raça:	<input type="checkbox"/> Sem raça definida <input type="checkbox"/> Com raça definida Qual?
<b>III MANEJO</b>	
11- Tipo de criação:	<input type="checkbox"/> Domiciliar <input type="checkbox"/> Semi-domiciliar <input type="checkbox"/> Solto
12- Alimentação :	<input type="checkbox"/> Ração comercial <input type="checkbox"/> Alimento preparado em casa <input type="checkbox"/> Ambos Que ração?



13- Tem contato com outros animais? <input type="checkbox"/> sim <input type="checkbox"/> não
14 – Se sim, com quais? <input type="checkbox"/> Eqüídeos <input type="checkbox"/> Silvestres <input type="checkbox"/> Felinos <input type="checkbox"/> Cães <input type="checkbox"/> Suínos
15- Existem outras formas de contato? <input type="checkbox"/> Animais em casa <input type="checkbox"/> Vizinhos tem animais <input type="checkbox"/> O seu animal vai ao petshop <input type="checkbox"/> Passeios constantes
16- Qual o ambiente onde o animal é criado? <input type="checkbox"/> Terra <input type="checkbox"/> Cimento <input type="checkbox"/> Terra/cimento
17- É realizada limpeza ou desinfecção do local? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
18- Com que frequência? <input type="checkbox"/> Diária <input type="checkbox"/> Semanal <input type="checkbox"/> Quinzenal <input type="checkbox"/> Mensal
19- O animal tomou alguma vacina? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
20- Se sim, quais? <input type="checkbox"/> Anti-rábica <input type="checkbox"/> Contra viroses <input type="checkbox"/> Ambos
21- O animal já foi vermifugado? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
22- Se sim, quando?
23- O animal apresenta ou já apresentou carrapatos? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
<b>IV EXAME FÍSICO</b>
- Aspecto geral do animal: